

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Interacções entre a temperatura e  
dieta em *Hyla arborea*. Como  
responde esta espécie a uma onda  
de calor?

**Nuno Alexandre Leonardo Gonçalves**

Dissertação  
Mestrado em Biologia da Conservação

2015

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Interacções entre a temperatura e  
dieta em *Hyla arborea*. Como  
responde esta espécie a uma onda  
de calor?

**Nuno Alexandre Leonardo Gonçalves**

**Dissertação**

Mestrado em Biologia da Conservação

**Orientador**

Professor Rui Rebelo

2015

Esta dissertação de mestrado foi desenvolvida no âmbito do Projecto “Does temperature affect diet choice by aquatic ectotherms?” (Projecto EXPL\_BIA-ANM\_0932\_2012), financiado por fundos nacionais através da FCT/MEC (PIDDAC) no âmbito do Programa Exploratórios 2012.

As posturas de *Hyla arborea* utilizadas neste projecto foram colhidas com a autorização do ICNF (Licença nº 211/2014/CAPT).

Ao meu pai.

# Agradecimentos

---

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que contribuíram directa ou indirectamente para que esta tese fosse possível. Nomeadamente:

- Ao Professor Rui Rebelo. Sem o seu apoio incansável e disponibilidade esta tese não teria sido possível. Gostaria também de agradecer toda a paciência que teve para me aturar, desde as minhas teorias doidas aos meus "rallys" em Grândola, eu sei que às vezes posso ser chato mas garanto-lhe que ainda vai ter saudades minhas! Gostaria também de agradecer o facto de ter sido por si que soube do lançamento do *single* "Lazaretto" e do Álbum com o mesmo nome do Jack White; essa obra fantástica foi uma enorme companhia durante o meu trabalho
- Ao Bruno Carreira. Por todo apoio na realização desta tese (só suplantado pelo ícone da ciência que foi acima referido) especialmente nas horas más. Também gostava de salientar o bom humor e capacidade crítica que permitiram sempre criar um bom ambiente de trabalho (já para não falar do contributo musical como DJ do laboratório)
- Ao Professor Paulo Fonseca. Por ter disponibilizado o espaço no biotério onde ocorreu toda a fase experimental deste trabalho
- Ao Ricardo Rodrigues. Que após tantos trabalhos juntos ainda teve paciência para me ajudar na tese sempre que eu lhe pedia e para me apoiar nas piores alturas. Eu sei que depois de tanta ajuda eu não deveria de gozar com a tua careca, mas é mais forte do que eu...
- Ao Vítor de Figueiredo. Meu amigo desde o primeiro dia de escola da primeira classe (já vai para 19 anos) cuja sua ajuda foi preciosa na captura dos ovos e que até chegou a por em perigo a sua pele, pois para me ajudar teve de fugir à sua namorada alemã que não aprovava os sacrifícios de girinos
- À Vanessa Pinto. Pela sua preciosa ajuda no laboratório e no campo. Também de referir as suas capacidades culinárias de topo, ninguém queima pizzas

congeladas como ela! Só foi pena ter-me semi-partido o dedo, mas pronto fica para recordação

- À Catarina Penim. Por ter ajudado a Vanessa a ajudar-me quando tive as minhas mini-férias para ir ao SBSR
- À Vânia Baptista. Por ser uma jóia e limpar-me as coisas sem eu pedir! Devo dizer que até me emocionei quando soube que esta rapariga ia voltar para trabalhar nos isótopos!
- À Raquel Marques. Pela sua destreza e sensatez no manuseio dos animais, principalmente no que diz respeito aos sacrifícios. Se a biologia não der, esta rapariga tem futuro garantido no negócio dos talhos.
- Ao Anxo Conde. Por toda a ajuda e pelas lições de vida dadas enquanto trabalhávamos.
- Ao Daniel Alves. Pela ajuda no campo e por me ter recebido na sua sala do biotério
- Ao Marco Machado. Por me ter ajudado na libertação dos girinos em excesso
- Ao meu irmão e à minha mãe. Por me terem ajudado no campo e no laboratório sempre que pedi
- Ao meu pai. Cujo falecimento prematuro faz com que o culminar deste trabalho não tenha o mesmo significado

# Resumo

---

Nas últimas décadas o número de extinções e de espécies de anfíbios em perigo tem vindo a aumentar exponencialmente.

Um dos factores de maior importância nesse aumento são as alterações climáticas. É importante avaliar as consequências destas alterações nos climas temperados, nomeadamente em animais ectotérmicos como os anfíbios, e em habitats conhecidamente vulneráveis a estes factores como são os charcos temporários.

O objectivo desta tese foi avaliar a capacidade que os girinos da rela-comum, *Hyla arborea*, têm de alterar os seus hábitos alimentares como resposta a diferentes temperaturas, incluindo situações extremas (ondas de calor). Para tal, os girinos foram submetidos a cinco tratamentos de diferentes de temperatura ("Primavera Fria", "Primavera Quente", "Primavera Normal", "Onda de Calor no início do desenvolvimento larvar", "Onda de Calor no fim do desenvolvimento larvar"). Estes tratamentos foram ainda cruzados com três dietas ("Vegetal", "Animal" e "Mista", esta última permitindo a escolha por parte do girino).

Os girinos desenvolveram-se muito rapidamente quando sujeitos a temperaturas elevadas, mas metamorfosearam-se com menores dimensões e com menos reservas energéticas que os dos restantes tratamentos, principalmente quando comparados com os que se desenvolveram no frio.

Na generalidade dos parâmetros analisados houve evidências de que os girinos sujeitos à dieta "Mista" escolheram diferentemente consoante a temperatura a que estiveram expostos; esta dieta foi a que permitiu aos seus consumidores atingirem os melhores resultados. Já a dieta "Vegetal" foi benéfica apenas nos tratamentos que requeriam um desenvolvimento larvar mais acelerado, em "Primavera Quente".

Foram ainda registadas alterações comportamentais resultantes das ondas de calor, apenas significativas para uma onda de calor aplicada na fase inicial o desenvolvimento larvar, onde os consumidores da dieta "Animal" aumentaram a sua actividade. A dieta "Mista" foi a mais favorável num contexto de uma onda de calor, pois esta foi a que possibilitou um desenvolvimento mais acelerado como resposta a este factor.

**Palavras-chave:** *Hyla arborea*; Alterações Climáticas; Dieta; Temperatura; Charcos Temporários; Onda de Calor

# Abstract

---

In the last decades the number of extinct and endangered amphibian species has increased dramatically.

One of the major factors advanced to explain this problem is climate change. The analysis of their impacts on temperate climates is very important, especially in ectotherms like the amphibians and in environments known by their vulnerability to warming, like temporary ponds.

The objective of this thesis was to evaluate the ability of *Hyla arborea* tadpoles to change their feeding habits in response to different temperatures, especially in an extreme event (a heat wave). The tadpoles were divided into five temperature treatments ("Cold Spring", "Warm Spring", "Normal Spring", "Heat Wave during early development", "Heat Wave during late development"). In each of the previous treatments the tadpoles were divided into three groups, each one with a different diet ("Vegetal", "Animal" and "Mixed"; the last one allowed the tadpoles to choose).

The tadpoles developed much faster when subjected to high temperatures, but at the cost of a smaller size at metamorphosis and with less energetic reserves than the other ones, especially when compared with the ones subjected to the cold temperatures.

The diet "Mixed" allowed its consumers to perform better in the majority of the parameters analyzed, and there were evidences of differential diet choice according to the temperature treatment. The "Vegetal" diet was only beneficial when the tadpoles were in an environment that required a fast development, in "Warm Spring".

The heat waves caused behavioral changes, although only significant for the one applied during early development, where the consumers of "Animal" were more active. The "Mixed" diet was more favorable in the animals subjected to heat waves because it was the diet that allowed its consumers to develop faster.

**Key-words:** *Hyla arborea*; Climate Change; Diet; Temperature; Temporary Ponds, Heat Wave



# Índice

---

<b>Introdução.....</b>	<b>3</b>
A rela-comum, <i>Hyla arborea</i> (Linnaeus, 1758).....	6
Objectivo da tese .....	8
<b>Métodos .....</b>	<b>10</b>
Local de colheita.....	10
Desenho experimental.....	10
Parâmetros medidos durante o período experimental .....	12
Comportamento.....	12
Parâmetros medidos após a primeira onda de calor (dia 30) .....	13
Comprimento da cabeça dos girinos (dia 30).....	13
Peso (dia 30).....	14
Estádios de desenvolvimento (dia 30).....	14
Parâmetros medidos nos metamorfoseados .....	14
Peso .....	15
Comprimento focinho-cloaca (SVL) e comprimento da tíbio-fíbula (TFL).....	15
Saltos .....	15
Análise estatística .....	16
<b>Resultados .....</b>	<b>18</b>
Mortalidade .....	18
Comportamento antes, durante e após a primeira onda de calor .....	20
Comportamento antes, durante e após a segunda onda de calor .....	22
Comprimento da cabeça dos girinos (dia 30) .....	23
Peso (dia 30).....	25
Estádios de desenvolvimento (dia 30).....	26
Período Larvar .....	27
SVL dos recém-metamorfoseados .....	29
Peso dos recém-metamorficos .....	30
TFL/SVL .....	31
Saltos/TFL .....	33
Resistência/peso.....	34

<b>Discussão .....</b>	<b>36</b>
<b>Qual a melhor dieta a cada temperatura .....</b>	<b>37</b>
<b>Houve escolha da dieta ideal nos indivíduos submetidos a uma dieta mista? .....</b>	<b>39</b>
<b>Efeitos das ondas de calor .....</b>	<b>42</b>
<b>Conclusões .....</b>	<b>45</b>
<b>Referências bibliográficas .....</b>	<b>47</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>56</b>

# Introdução

---

Actualmente, um dos maiores desafios com que a Biologia da Conservação se depara é o declínio acentuado, e muito mais rápido que o normal, das espécies de anfíbios a nível mundial (Blaustein *et al.*, 1994a; Stuart *et al.*, 2004; Beebee e Griffiths, 2005; Wake e Vredenburg, 2008; Keith *et al.*, 2014; IUCN, 2015). Este fenómeno tem despertado grande interesse na comunidade científica por três razões distintas: são eventos relativamente recentes, estão a ocorrer em simultâneo em locais bastante distantes (Stuart *et al.*, 2004), e ocorrem igualmente em áreas protegidas (Collins e Storfer, 2003).

Os anfíbios são particularmente susceptíveis às alterações ambientais (Keith *et al.*, 2014) devido a aspectos particulares da sua biologia, tais como: um ciclo de vida complexo na maioria das espécies, no qual os indivíduos em estado larvar requerem habitats e alimentos diferentes dos que consomem em estado adulto; a diversidade de estratégias reprodutivas; a elevada permeabilidade da pele. Deste modo, os anfíbios são bioindicadores (Blaustein, 1994b; Mifsud, 2014; Walls *et al.*, 2014), já que estas características fazem com que sejam dos primeiros a sentir as alterações ambientais e outros impactos que surjam nos seus habitats (Lips, 1998; Burrowes, 2004).

Até hoje várias hipóteses foram avançadas para explicar o declínio dos anfíbios: competição com espécies exóticas (Rodríguez *et al.*, 2004; Preston *et al.*, 2012); sobre-exploração (Oza, 1990; Lannoo *et al.*, 1994); destruição de habitats (Gibbons *et al.*, 2000; Zancolli *et al.*, 2014); uso de pesticidas e outros químicos em práticas agrícolas (Buck *et al.*, 2012; Baker *et al.*, 2013); epidemias (Daszak *et al.*, 1999; Lips, 1999; Buck *et al.*, 2012); radiações UV (Blaustein *et al.* 2003; Bancroft *et al.*, 2007; Ortiz-Santaliestra, 2011); alterações climáticas (Kiesecker *et al.* 2001; Collins e Storfer, 2003).

O crescente número de eventos climáticos extremos registados nas últimas décadas tem sido amplamente estudado e, muitas vezes, associado às alterações climáticas em curso, com impactos a nível económico, social e biológico (Meehl *et al.* 2001; Jungo e Beniston, 2001; Beniston e Stephenson, 2004; Bernstein *et al.*, 2007; Trigo *et al.* 2009). Um pouco por todo o mundo registou-se um aumento nas

temperaturas médias anuais e, simultaneamente, um aumento da frequência e da intensidade de um fenómeno extremo que intensifica os impactos do aquecimento global – as ondas de calor (Meehl e Tebaldi, 2004; Schär *et al.*, 2004; Reusch *et al.*, 2005; Della-Marta *et al.*, 2007; Bernstein *et al.*, 2007; Trigo *et al.* 2009; Fischer e Schär, 2010). Define-se uma onda de calor como um período em que a temperatura máxima diária ultrapassa em pelo menos 5°C a temperatura média máxima de referência durante mais de cinco dias consecutivos (Frich *et al.*, 2002). Apesar de as definições de onda de calor variarem esta é sempre medida tendo em conta a área geográfica e as temperaturas normais para a época (Frich *et al.*, 2002).

As ondas de calor têm grandes impactos nos ecossistemas (Meehl e Tebaldi, 2004) e os charcos temporários são particularmente sensíveis a estes eventos climáticos extremos (Blaustein *et al.*, 1999). Devido à sua natureza efémera, as flutuações térmicas podem ter impactos fortes na sua temperatura e duração e, como tal, em toda a fauna neles existente (Semlitsch, 1987, Blaustein *et al.*, 1999; R., Zacharias *et al.*, 2007; Toranza e Maneyro, 2013; Vinagre *et al.* 2015), nomeadamente na anfíbiofauna (Semlitsch, 1987; Blaustein *et al.*, 1999; Semlitsch, 2000; Jakob *et al.* 2003), pois os estádios larvares de grande parte destas espécies (e de todas as da península ibérica) (Barbadillo *et al.*, 1999), só ocorrem neste tipo de habitats. Fenómenos como as ondas de calor podem ainda contribuir para a dispersão de epidemias, como por exemplo a quitidromicose, como já foi reportado na onda de calor que afectou a Europa em 2003 (Scott *et al.*, 2003).

Os anfíbios são animais ectotérmicos e, por isso, a temperatura tem uma influência muito grande ao nível dos seus processos fisiológicos, podendo influenciar as taxas de consumo de oxigénio, batimento cardíaco, balanço de água no organismo, processo digestivo, taxa de desenvolvimento, e imunidade (Rome *et al.*, 1992).

As alterações na temperatura ou na precipitação também têm potencial para alterar diversos aspectos na reprodução dos anfíbios (Carey e Alexander, 2003; Blaustein *et al.*, 2010). Este fenómeno tem sido bastante evidente nas zonas temperadas, já que em alguns estudos verificou-se que as alterações nos padrões sazonais levaram a modificações no período reprodutivo e/ou de eclosão dos ovos (Blaustein *et al.*, 2001; Blaustein *et al.*, 2010; Todd *et al.* 2011), dependendo da espécie.

A península Ibérica é uma zona de particular interesse para o estudo de respostas a alterações de temperatura e precipitação, devido à influência do clima mediterrânico, mais seco e variável do que se observa no resto da Europa (Giorgi e Lionello, 2007; Carvalho *et al.*, 2010). Muitas das espécies e populações de anfíbios que ocorrem na península Ibérica já se encontram normalmente em habitats sujeitos a um elevado stress hidrológico. Como tal, fenómenos que aumentem a temperatura ou provoquem um aumento da desertificação poderão causar impactos significativos na dispersão das espécies (Araújo *et al.*, 2006; Sillero, N., 2009; Méchan *et al.*, 2004).

Durante o seu crescimento, principalmente quando este é acelerado, todos os organismos têm de sintetizar uma grande quantidade de proteínas (Liess *et al.*, 2013). A síntese de proteínas em animais é mediada através dos ribossomas, que contêm RNA rico em fósforo (Liess *et al.*, 2013). Como tal, todos os organismos com taxas de crescimento elevadas devem ter um elevado consumo de fósforo (Sternner e Elser, 2002; Hensen *et al.*, 2002; Liess *et al.*, 2013). Ao mesmo tempo, devem também apresentar um consumo, e consequentemente uma necessidade, elevada de alimentos ricos em nitrogénio, pois este é igualmente essencial na estruturação das proteínas (Sternner e Elser, 2002; Liess *et al.*, 2013).

Até há bem pouco tempo pensava-se que os girinos (formas larvares dos anuros) eram apenas herbívoros ou detritívoros (Altig *et al.*, 2007; Schiesari *et al.*, 2009; Colón-Gaud *et al.*, 2010; Costa e Vonesh, 2013). Durante muito tempo foi excluída a possibilidade de estes ingerirem qualquer tipo de material de origem animal devido à extensão do seu tubo digestivo, à abundância de material vegetal no intestino de animais colhidos no campo e à fisionomia das estruturas (dentículos) que utilizam para a recolha de alimentos (Altig *et al.*, 2007). No entanto, a ingestão de detritos pode não significar uma alimentação estritamente herbívora, mesmo quando estes têm origem a partir de tecido vegetal. Isto acontece porque à medida que o processo de decomposição vai avançando e os tecidos vegetais se alteram são incorporadas grandes quantidades de micróbios. Como tal, ao optarem por esta via os girinos podem estar a alimentar-se principalmente destes micróbios e de materiais extracelulares associados, ingerindo assim produtos com um conteúdo nutritivo mais semelhante a uma alimentação tipicamente carnívora (Altig *et al.*, 2007; Schiesari *et al.*, 2009).

Actualmente, os girinos já são considerados na sua generalidade como omnívoros (Duellman e Trueb, 1986; Altig *et al.* 2007, Schiesari *et al.* 2009). Para a mudança deste paradigma contribuiu o aparecimento de técnicas como a análise de isótopos estáveis, que permitiram identificar com maior exactidão qual a origem da matéria orgânica que era realmente assimilada (Hunte-Brown, 2006; Altig *et al.* 2007). Ao mesmo tempo, já foram documentados diversos casos de canibalismo (Crump, 1983; Crump, 1990; Altig *et al.*, 2007; Crossland e Shine, 2011), bem como o consumo de alguns invertebrados (Altig *et al.*, 2007). A omnivoria pode ser uma grande vantagem para estes organismos ectotérmicos, pois confere-lhes alguma plasticidade na sua dieta e uma maior capacidade de resposta às alterações no seu habitat, incluindo às resultantes de alterações na temperatura (Álvarez e Nicieza, 2002a; Paglianti e Gherardi, 2004; Cook *et al.*, 2011).

As formas larvares de anfíbios de climas temperados vivem em habitats efémeros e muito susceptíveis a flutuações térmicas (Blaustein *et al.*, 1999; Richter-Boix *et al.*, 2006). Assim, em anos muito quentes é natural que tenham alguma plasticidade para acelerar o seu metabolismo e metamorfosear-se mais depressa, sob pena de perder o seu habitat e morrer (Kupferberg, 1997; Álvarez e Nicieza, 2002a; Álvarez e Nicieza, 2002b), mesmo que este processo tenha como custo um tamanho corporal à metamorfose mais reduzido (Gervasi e Foufopoulos, 2008; Márquez-García *et al.*, 2009; Searcy *et al.*, 2014). Contra-intuitivamente, uma alimentação baseada em proteína animal pode não ser a mais apropriada neste caso, pois a proteína necessita de uma digestão mais demorada e que é mais dispendiosa energeticamente (Álvarez e Nicieza, 2002a). Como tal, os girinos poderão optar por uma dieta mais rica em carboidratos (por exemplo, baseada em matéria vegetal) que, apesar de ser mais pobre em proteínas que a animal, tem uma digestão mais rápida e menos dispendiosa (Cook *et al.*, 2011).

### **A rela-comum, *Hyla arborea*(Linnaeus, 1758)**

---

Os adultos de rela-comum têm um comprimento médio a rondar os 5cm (Arnold e Ovenden, 2004), apresentam uma coloração dorsal verde clara e ventral creme. Nesta espécie, a risca preta lateral estende-se por todo o corpo, distinguindo-a da outra rela residente em Portugal, a rela-meridional, *Hyla meridionalis* (Boettger, 1874), na qual a risca preta termina logo após o tímpano.

Nos estádios larvares (girinos) a característica que distingue estas duas espécies é novamente uma linha lateral, mas neste caso ao longo da musculatura da barbatana caudal: enquanto *Hyla arborea* apresenta apenas uma risca, *Hyla meridionalis* apresenta duas muito finas (García-París *et al.*, 2004).

O período reprodutor da rela-comum ocorre na Primavera e em corpos de água parada, como lagos, charcos, reservatórios, pântanos e poças (Kaya *et al.*, 2009), preferencialmente com exposição ao sol e vegetação aquática abundante (Arnold e Ovenden, 2004). Estima-se que as fêmeas de *H. arborea* possam colocar entre 255 a 1252 ovos, num máximo de 59 posturas durante uma época de reprodução (García-París *et al.*, 2004), podendo em cada uma existir entre 3 a 60 ovos (Arnold e Ovenden, 2004).

A eclosão dos ovos dá-se entre 12 a 15 dias após a postura; as larvas recém-eclodidas têm um comprimento médio entre 5 a 8 mm, podendo atingir um máximo de 49 mm ao longo de todo o seu desenvolvimento larvar. O período larvar dura cerca de 3 meses. O tamanho dos indivíduos recém-metamorfoseados é em média de 14 a 15mm (García-París *et al.*, 2004).

A dieta dos girinos, tal como na generalidade dos estádios larvares de anuros, ainda não está completamente clarificada. Neste contexto, os alimentos dos girinos desta espécie podem não ser muito diferentes dos encontrados nos conteúdos intestinais das espécies analisadas por Shiesari *et al.*(2009): *Rana catesbeiana*, *Rana clamitans*, *Rana pipiens*, e *Rana sylvatica*, estudadas em zonas húmidas do estado do Michigan, E.U.A.. Os girinos destas espécies consomem protozoários, microcrustáceos e insectos, assim como algas, detritos e plantas aquáticas (Schiesari *et al.*, 2009).

Em Portugal continental, *Hyla arborea* está amplamente distribuída, mas em populações fragmentadas (Carretero *et al.*, 2003). Distribui-se preferencialmente pela zona a norte do rio Tejo, apresentando uma distribuição limitada a sul deste rio (Godinho *et al.*, 1999). Esta espécie ocupa habitats com níveis de humidade elevados e com charcos temporários de água estagnada com um hidroperíodo extenso (Arnold e Ovenden, 2004; Alves, 2008). Num contexto de aquecimento global e de aumento da frequência e da intensidade das ondas de calor, esta selecção de habitat pode ser desvantajosa para *Hyla arborea*. Esta espécie está adaptada a climas temperados e com sazonalidade pouco marcada e pode ter dificuldades em adaptar-se a situações que

requeriram um desenvolvimento mais acelerado dos estádios larvares. Como tal, numa perspectiva de conservação desta espécie, é importante estudar as suas respostas fisiológicas e comportamentais para avaliar o risco resultante das alterações climática sem curso.

## **Objectivo da tese**

---

O objectivo desta tese foi avaliar a capacidade que os girinos de *Hyla arborea* têm de alterar os seus hábitos alimentares como resposta a diferentes temperaturas, incluindo situações extremas (ondas de calor). Ao mesmo tempo procurou-se identificar consequências destas alterações nos seus parâmetros corporais, quer na sua fase larvar quer após a metamorfose, incluindo estimativas da sua *fitness* ligadas à fuga a predadores, como a capacidade de salto dos recém-metamorfoseados e a sua resistência ao exercício. Para tal, os girinos de *Hyla arborea* foram submetidos a 5 tratamentos diferentes de temperatura (frio, quente, aumento gradual da temperatura e mais dois tratamentos com aumento gradual ao qual foi aplicada uma onda de calor, cedo ou tarde durante o período larvar). Estes tratamentos foram ainda cruzados com 3 dietas (vegetal, animal e mista, esta última permitindo a escolha por parte do girino).

É esperado que os girinos sujeitos a temperaturas mais baixas apostem mais em crescimento corporal e, por isso, tenham maior peso à metamorfose que os indivíduos sujeitos a temperaturas altas (Kupferberg, 1997). Por outro lado, é esperado que os indivíduos submetidos a temperaturas mais elevadas apostem menos em crescimento corporal e mais na aceleração do seu desenvolvimento (Gervasi e Foufopoulos, 2008; Márquez-García *et al.*, 2009; Searcy *et al.*, 2014). Estas assumpções resultam da duração do seu habitat, os charcos temporários, estar dependente da temperatura. A aceleração do seu desenvolvimento deverá ter como resultado um período larvar mais curto e, consequentemente um menor tamanho corporal à metamorfose (Álvarez e Nicieza, 2002a; Blaustein *et al.*, 2010; Rudolf e Singh, 2013).

É esperado que em todas as temperaturas os girinos aos quais é oferecida uma dieta mista apresentem os resultados mais positivos, uma vez que podem escolher entre dois itens alimentares e adaptar a sua dieta ao ambiente térmico onde estão inseridos. Para as outras dietas, é esperado que a dieta vegetal seja mais favorável no tratamento quente e que a dieta animal seja mais favorável no tratamento frio.



Relativamente ao período larvar, este deverá ser mais curto nos girinos sujeitos a temperaturas elevadas, seguidos pelos girinos dos tratamentos da primeira e segunda ondas de calor. Uma vez que os indivíduos sujeitos a uma dieta mista podem escolher a melhor combinação de alimentos, estes deverão ter o período larvar mais curto em todos os tratamentos, enquanto os sujeitos à dieta vegetal só deverão ter períodos larvares mais curtos que os da dieta animal no tratamento quente.

Por último, é esperado que a capacidade de salto e a resistência dos recém-metamorfoseados sejam inferiores nos indivíduos sujeitos à temperatura quente e superiores nos indivíduos sujeitos ao frio, uma vez que é expectável um maior tamanho à metamorfose nos últimos. Para a dieta espera-se o mesmo padrão apresentado anteriormente, com a dieta mista a ser sempre a mais favorável e a dieta vegetal a ser mais favorável que a animal apenas no tratamento de temperatura quente.

# Métodos

---

## Local de colheita

---

As posturas de *Hyla arborea* foram recolhidas em charcos temporários situados numa zona florestal nas proximidades da Verdizela (concelho do Seixal) e da área adjacente à Área de Paisagem Protegida da Arriba Fóssil da Costa da Caparica. Nesta zona o clima é do tipo mediterrânico sub-húmido, com Verões quentes e secos e Invernos temperados (Costa, 2011). A temperatura média anual é de 16°C e a precipitação média anual de 735mm (Costa, 2011).

As posturas foram colhidas apenas num charco somente alimentado pela água das chuvas (coordenadas: 38°34'29.1"N 9°08'37.1"W), que se dividiu em 3 charcos menores durante o período de trabalho de campo. Ao longo dos trabalhos a profundidade rondou os 40cm.

A flora em redor dos charcos caracteriza-se pela abundância de espécies esclerófilas arbustivas intercaladas com algumas espécies de maior porte, com predominância de *Pinus pinea*. A flora aquática é dominada por plantas vasculares e a fauna aquática inclui várias espécies de anfíbios, com destaque para algumas espécies com elevada abundância: *Hyla arborea*, *Pelophylax perezi* e *Pelobates cultripes*.

## Desenho experimental

---

A experiência decorreu nas instalações do biotério da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. A chegada dos ovos a estas instalações ocorreu entre 27 de Março de 2014 e 6 de Maio de 2014. O período experimental decorreu entre 25 de Junho e 16 de Dezembro de 2014.

Numa fase inicial foram colocados cerca de 20 ovos por aquário com água corrente envelhecida (1L). Até à eclosão, os ovos foram mantidos à temperatura ambiente do biotério (regulada para variar entre os 18°C e os 20°C).

Após a eclosão, os indivíduos foram mantidos nos mesmos aquários até atingirem o estágio Gosner 25 (quando se dá o fecho do opérculo sobre as brânquias) (Gosner,

1960). Nesta fase os girinos foram submetidos a uma alimentação à base da ração comercial para peixes "PondSticks" da marca Tetra®. A água foi renovada 3 vezes por semana e os girinos foram alimentados após a mudança de água.

Após atingirem o estágio Gosner 25 os girinos foram colocados individualmente em aquários de plástico com um volume de 400mL e sujeitos a um fotoperíodo de 12L:12E. Todos os aquários foram colocados em tanques de água, cada um com capacidade para 28 aquários.

A temperatura ambiente do biotério foi regulada através do sistema de ar condicionado existente, sendo a temperatura da sala a mesma dos aquários do grupo Frio. Para assegurar a temperatura para os restantes grupos foram colocados termóstatos da marca BOY-U nos tanques de água. A temperatura foi monitorizada diariamente em todos os tanques, através de termómetros que se encontravam em permanência em cada um deles, e os termóstatos foram regulados sempre que necessário.

A experiência realizada foi factorial completa, de forma a testar todas combinações de tratamentos de dieta e de temperatura. Foram estabelecidos 5 grupos de temperatura diferentes:

- 1) Primavera quente (Q), com temperatura constante de 25°C;
- 2) Primavera normal (N), onde ao longo das 9 semanas de período experimental a temperatura foi aumentada progressivamente, 1°C por semana, a partir de 17°C até atingir 25°C entre a sétima e oitava semana (**Figura 1**);
- 3) Onda de calor 1 (OC1), semelhante ao tratamento anterior mas com um pico de temperatura correspondente a uma semana a 25°C a ocorrer durante a quarta semana (**Figura 1**);
- 4) Onda de calor 2 (OC2), idêntico à “primavera normal”, mas com um pico de temperatura correspondente a uma semana a 25°C a realizar-se à sétima semana (**Figura 1**);
- 5) Primavera Fria (F), com temperatura constante de 17°C.

Foram também estabelecidos 3 tipos de dietas diferentes:

- a) carnívora (dieta A), com base em larvas congeladas de quironómídeo (Ocean Nutrition®);

- b) herbívora (dieta P), com *Ranunculus peltatus* (Schrunk, 1789 ), recolhido em charcos temporários da Serra de Grândola;
- c) mista (dieta M), com a oferta simultânea dos dois itens anteriores.

No total foram estabelecidos 15 grupos experimentais com 28 réplicas (indivíduos) por grupo, com excepção do tratamento onda de calor 2, onde os grupos sujeitos à dieta animal e à dieta mista tiveram 15 indivíduos e o grupo sujeitos à dieta vegetal teve 16. Cada unidade experimental (aquário) conteve apenas 1 girino, num total de 382 aquários.

		Semana									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	9
Sessão fotográfica 1											
Temperatura nos tratamentos N; OC1 e OC2 (°C)	17										
	18										
	19										
	20				* <sup>1</sup>						
	21										
	22							* <sup>2</sup>			
	23										
	24										
	25										
Medição de comportamentos 1											
Onda de calor 1											
Sessão fotográfica 2											
Sacrifício de indivíduos											
Medição de comportamentos 2											
Onda de calor 2											
Dissecção e medições corporais											
Medições de saltos		Ocorreram após a reabsorção da cauda de cada indivíduo									
Início da experiência:		25-06-2014									
Fim da experiência:		16-12-2014									
* <sup>1</sup> A temperatura dos aquários OC1 foi de 25°C * <sup>2</sup> A temperatura dos aquários OC2 foi de 25°C											

**Figura 1 Cronograma das actividades realizadas durante o período experimental. Alguns animais ficaram na experiência muito para lá das 9 semanas, até completar a metamorfose.**

## Parâmetros medidos durante o período experimental

### Comportamento

As datas dos registos de comportamento foram definidas em função das ondas de calor (**Figura 1**). Assim, para cada grupo foram escolhidos 3 dias para os registos de comportamento: o primeiro dia foi marcado antes da onda de calor, o segundo durante a onda de calor e o terceiro na semana após o seu término (**Figura 1**). Em cada dia de

observação o nível de actividade de cada indivíduo foi registado em 5 sessões espaçadas por intervalos de 30 minutos, através da avaliação pontual do seu nível de actividade. Foram considerados activos os indivíduos que estivessem a nadar, independentemente da velocidade, e ainda os que estivessem a mexer a cauda. Foram considerados inactivos todos os indivíduos que não efectuassem qualquer tipo de movimento.

### **Parâmetros medidos após a primeira onda de calor (dia 30)**

Após "Onda de Calor 1" foram sacrificados indivíduos de todos os tratamentos (**Figura 1**), à excepção do tratamento "Onda de Calor 2" (à altura, os girinos deste tratamento ainda não tinham sido sujeitos à onda de calor), de forma a serem utilizados em análises isotópicas num outro estudo. O número de indivíduos a sacrificar dependeu do número de mortes e de indivíduos metamorfoseados em cada tratamento. Na **Tabela 1** pode ver-se o número de girinos sacrificados por tratamento, mantendo-se os restantes girinos em experiência (14 por tratamento), até morrerem ou completarem a metamorfose.

**Tabela 1** Girinos sacrificados em cada tratamento de temperatura/dieta

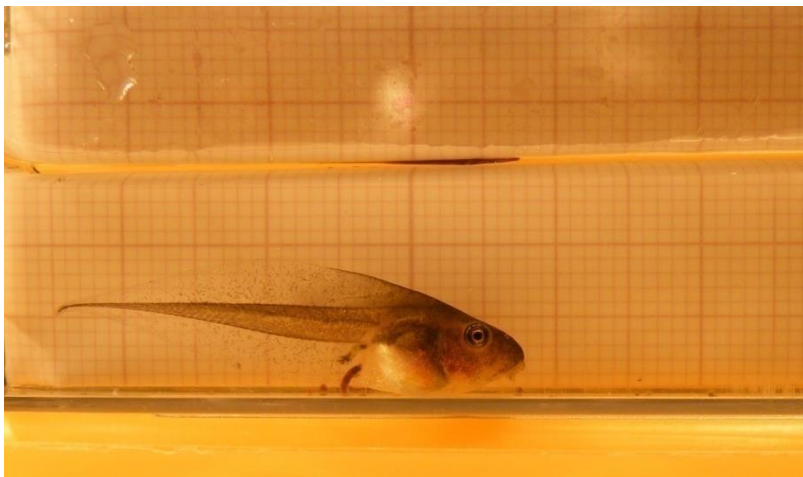
Tratamento (temp/dieta)		No. de Sacrifícios
<b>Girinos Sacrificados</b>	<b>F/P</b>	14
	<b>F/A</b>	12
	<b>F/M</b>	13
	<b>W/P</b>	14
	<b>W/A</b>	13
	<b>W/M</b>	6
	<b>N/P</b>	14
	<b>N/A</b>	13
	<b>N/M</b>	14
	<b>OC1/P</b>	12
	<b>OC1/A</b>	13
	<b>OC1/M</b>	13

### **Comprimento da cabeça dos girinos (dia 30)**

De forma a avaliar o crescimento dos indivíduos foram realizadas 2 sessões fotográficas, a primeira no início da experiência (dia 1) e a segunda logo após a primeira onda de calor (dia 30) (**Figura 1**).

Em cada sessão, os indivíduos foram colocados num pequeno aquário (2cmx10cmx6cm) revestido por papel milimétrico na sua face posterior e todas as fotografias foram tiradas em condições semelhantes(**Figura 2**).

A medição foi realizada a partir das fotografias, com o software de análise de imagem ImageJ, sendo a medição efectuada desde a ponta do focinho até à inserção da musculatura caudal.



**Figura 2** Exemplo de uma fotografia utilizada para a medição digital.

### **Peso (dia 30)**

Anteriormente à sua dissecação, todos os girinos sacrificados foram pesados numa balança de precisão centesimal.

### **Estádios de desenvolvimento (dia 30)**

Todos os girinos foram observados à lupa de forma a identificar o seu estágio de desenvolvimento(Gosner 1960).

### **Parâmetros medidos nos metamorfoseados**

---

Após o aparecimento dos membros anteriores (estádio Gosner 42), os girinos foram colocados em caixas individuais, mas com uma quantidade de água residual e com algum papel semi-submerso, de forma a poderem sair de água. Os girinos foram mantidos nestas caixas durante cerca de uma semana, até reabsorverem completamente a cauda, e assim completarem a metamorfose (estádio Gosner 46).

Em todos os metamorfoseados foram medidos os seguintes parâmetros:

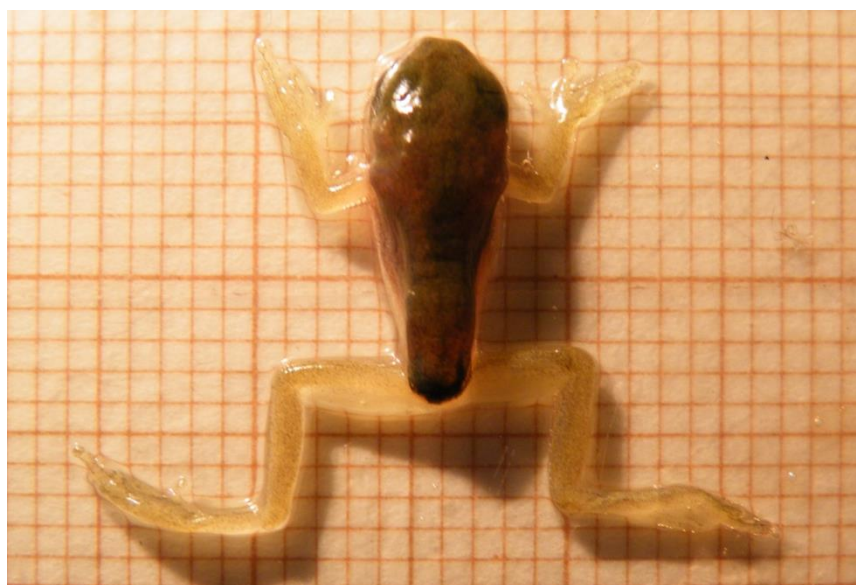
## Peso

Para a medição deste parâmetro foi utilizada uma balança de precisão centesimal.

## Comprimento focinho-cloaca (SVL) e comprimento da tíbio-fíbula(TFL)

Para efectuar estas medições os indivíduos foram colocados numa caixa de petri transparente com papel milimétrico por baixo e fotografados na mesma (**Figura 3**).

A medição das fotografias digitais foi realizada com o software de análise de imagem ImageJ.



**Figura 3** Exemplo de uma fotografia de recém-metamorfoseado utilizada na medição digital.

## Saltos

Após completarem a metamorfose, todos os indivíduos foram sujeitos a testes de salto (**Figura 1**) para avaliar a sua capacidade locomotora, fundamental para a fuga a predadores e obtenção de alimento. Na mesa de medições, marcou-se a posição inicial e a posição final de cada salto e, posteriormente, mediu-se a distância entre estas. Todos os indivíduos realizaram um total de 20 saltos divididos em 2 sessões, cada uma com 10 saltos, separadas por um período de 2 horas. Quando os indivíduos não saltaram por sua própria iniciativa, foram incentivados através dum suave toque na zona do uróstilo. Foram estudados dois aspectos: a capacidade de salto, calculando a média dos 3 maiores saltos entre os 20 saltos efectuados; a resistência, calculada como a diferença entre a média dos três primeiros saltos da primeira sessão e a média dos últimos três saltos da

segunda sessão. Um valor elevado deste último parâmetro será assim um indicador de uma baixa resistência individual.

## **Análise estatística**

---

Para testar possíveis diferenças no nível de actividade dos girinos sujeitos aos diferentes regimes de temperatura e de dieta nas três datas de observação relativas a cada onda de calor usaram-se Modelos Lineares Generalizados Mistos (GLMM), com uma distribuição binomial e “link function” logit. A variável dependente utilizada foi a actividade (estar ou não activo em cada uma das cinco sessões de cada data). A temperatura, a dieta e as datas foram incluídos no modelo como factores fixos. Como factores aleatórios utilizaram-se a sessão em que cada comportamento foi registado e o próprio indivíduo.

Após a primeira onda de calor, os efeitos dos vários regimes de temperatura e de dieta no comprimento da cabeça, no peso fresco e no estágio de desenvolvimento dos girinos foram avaliados com Modelos Lineares (GLM). Nestes modelos, a temperatura (4 níveis) e a dieta (3 níveis) foram incluídas na análise como factores fixos, testando-se a sua interacção. De forma a evitar erros de confundimento resultantes de diferenças nos comprimentos dos indivíduos no, as medições do dia 1 foram utilizadas como co-variável na análise.

No caso dos recém-metamorfoseados, os efeitos da temperatura e da dieta na duração do período larvar, no peso à metamorfose, no SVL, no TFL, na capacidade de salto e na resistência foram avaliados com Modelos Lineares (GLM). Nestes modelos, a temperatura (5 níveis, uma vez que para esta comparação já foi contabilizado o efeito da 2ª onda de calor) e a dieta (3 níveis) foram definidas como factores fixos, testando-se também a sua interacção. No caso do peso à metamorfose e do TFL realizaram-se análises posteriores incluindo o SVL como co-variável, de forma a descontar o efeito da diferença no tamanho dos recém-metamorfoseados. Da mesma forma, no caso da capacidade de salto fez-se uma nova análise incluindo o TFL como co-variável, uma vez que este comprimento apresentou uma correlação positiva com a capacidade de salto. Finalmente, no caso da resistência, fez-se uma nova análise em que utilizou como co-variável o peso à metamorfose.



Foi efectuada uma correlação de Spearman entre a duração do período larvar e as médias de mortalidade das várias combinações de tratamentos.

Os dados foram tratados na folha de cálculo do Microsoft Office Excel 2010. Os GLMMs foram efectuados com o programa IBM SPSS Statistics (versão 22.0). A normalidade e homocedasticidade dos dados, assim como as análises GLM e o teste de correlação de Spearman foram efectuados com o programa Statistica (versão 11). Em todos os testes o nível de significância considerado foi de 0.05, recorrendo-se ao teste *a posteriori* de Bonferroni quando se encontraram diferenças significativas.

# Resultados

## Mortalidade

As percentagens de mortalidade foram muito diferentes entre os indivíduos sujeitos aos tratamentos de temperatura "Primavera Fria" e "Primavera Quente", para todas as dietas. Em "Primavera Fria", os consumidores de "Planta" sofreram a maior mortalidade (21,4%), seguindo-se os consumidores das dietas "Mista" (20%) e "Animal" (17,6%). Em "Primavera Quente", os indivíduos sujeitos à dieta "Animal" e "Planta" apresentaram percentagens de mortalidade idênticas e relativamente baixas (6,7%), enquanto os consumidores de "Mista" não registaram quaisquer mortes (**Figura 4**).

Nos restantes tratamentos as percentagens de mortalidade diferiram bastante. Entre os indivíduos sujeitos a "Onda de Calor 1" são os consumidores de "Animal" que têm maior mortalidade (25%), ao passo que entre os indivíduos sujeitos a "Onda de Calor 2" são os consumidores de "Planta" (25%). Em "Primavera Normal", tal como em "Onda de Calor 1", os indivíduos que registaram maior mortalidade foram os consumidores de "Animal". É de referir que nas restantes dietas a mortalidade foi sempre inferior nos indivíduos do tratamento "Primavera Normal" sendo mesmo nula

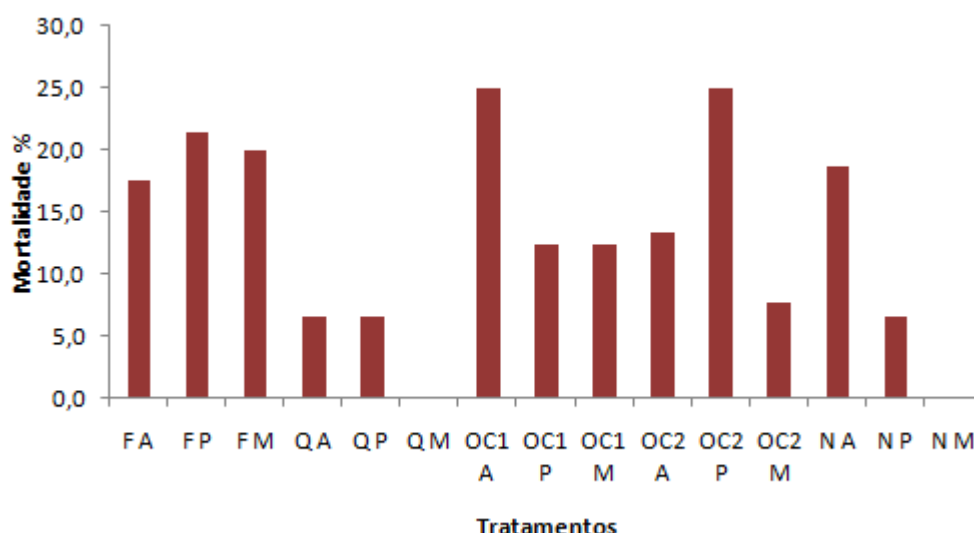
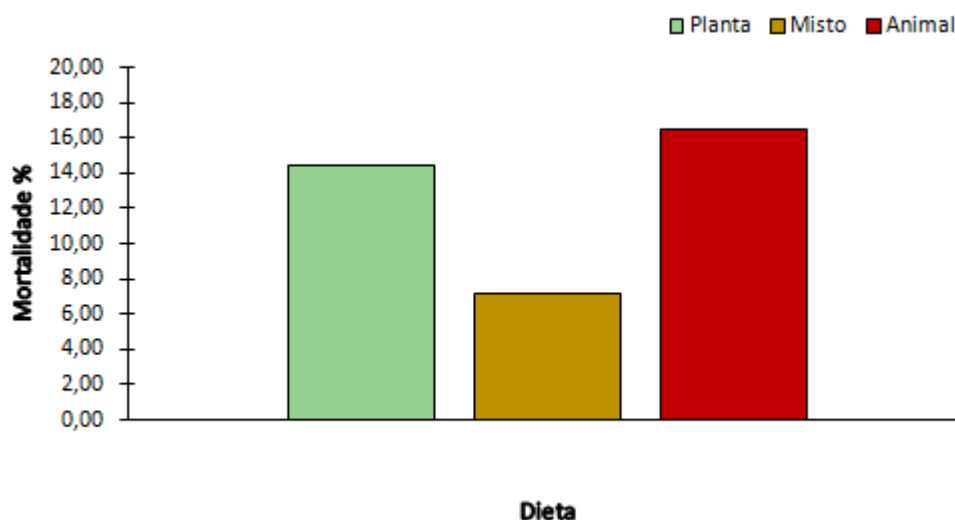


Figura 4. Percentagem de mortalidade em cada combinação de tratamentos. F- Frio; Q – Quente; N – Primavera Normal; OC1 – primeira onda de calor; OC2 – segunda onda de calor; A – dieta animal; P – dieta planta; M – dieta mista.

entre os consumidores da dieta "Mista" deste regime.

Ao restringirmos as observações sobre a mortalidade aos 3 tratamentos de dieta, verificou-se que a maior mortalidade incidiu sobre os consumidores de "Animal" (16,6%) e de "Planta" (14,47%), com mortalidades bastante superiores aos consumidores da dieta "Mista" (7,14%) (**Figura 5**).



**Figura 5.** Percentagem de mortalidade entre todos os consumidores de cada dieta.

Ao nível da temperatura, o tratamento "Primavera Fria" foi aquele em que se registou maior mortalidade (19,57%), muito contrastante com as obtidas para os indivíduos sujeitos a "Primavera Quente" (3,7%). Nos restantes tratamentos, os exemplares de "Onda de Calor 1" e "Onda de Calor 2" sofreram mortalidades semelhantes e elevadas (16,67% e 15,91%, respectivamente), enquanto os de "Primavera Normal" sofreram uma mortalidade mais baixa e próxima dos indivíduos do tratamento "Primavera Quente (8,51%) (**Figura 6**).

A correlação de Spearman entre o período lavar e a percentagem de mortalidade em cada combinação de tratamentos de temperatura e de dieta revelou resultados significativos, sendo positiva ( $r_s=0,658$ ) (**Figura 7**).

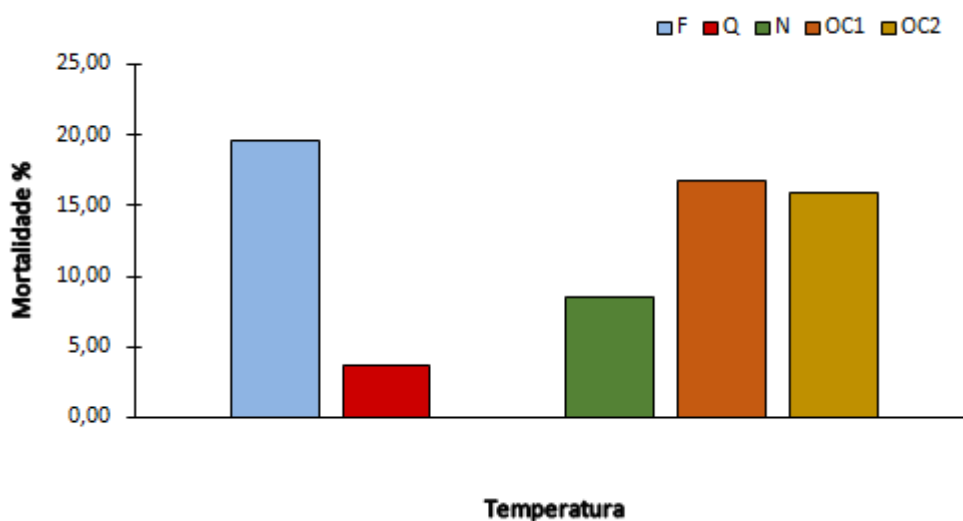


Figura 6 Percentagem de mortalidade entre todos os indivíduos sujeitos ao mesmo regime de temperatura.

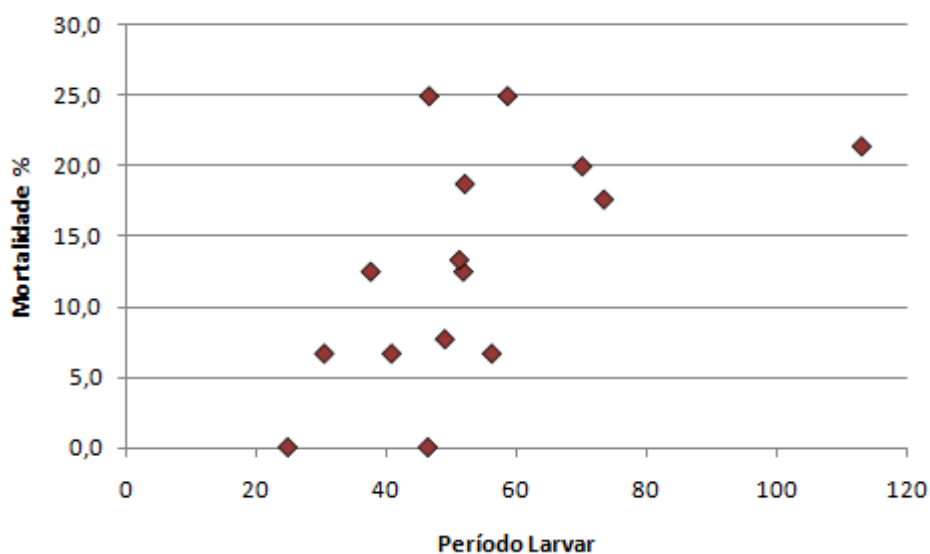
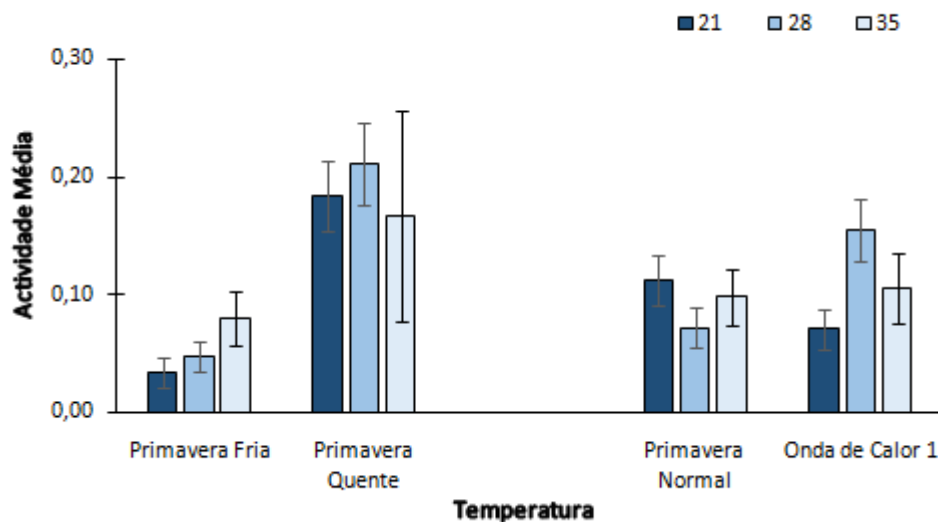


Figura 7 Relação entre a percentagem de mortalidade e o período larvar.

### Comportamento antes, durante e após a primeira onda de calor

Houve uma interacção significativa entre os efeitos da temperatura e da data sobre a proporção de indivíduos activos (GLMM,  $F_{6,3.752}=3,025$ ,  $P=0,006$ ). Esta interacção foi causada pelos tratamentos "Onda de Calor 1" e "Primavera Normal", que obtiveram resultados semelhantes em todas as datas à excepção do dia 28. Nesta data, coincidente com a onda de calor, os girinos sujeitos à "Onda de Calor 1" apresentaram um pico de actividade acentuado, estando mesmo muito próximos dos valores obtidos para os

indivíduos do tratamento "Primavera Quente" (**Figura 8**). Em todas as datas de amostragem os girinos do tratamento "Primavera Quente" foram sempre os mais activos; já os girinos submetidos ao tratamento "Primavera Fria" foram os menos activos, com uma actividade média a aproximar-se da dos restantes tratamentos apenas na última data. Com os testes *a posteriori* foi possível verificar que os girinos dos tratamentos "Primavera Fria" e "Primavera Quente" tiveram médias contrastantes em todas as datas e significativamente diferentes nos dias 21 e 28, sendo os indivíduos do



**Figura 8** Actividade média (probabilidade de um girino estar activo de cada vez que foi monitorizado) dos girinos sujeitos aos vários regimes de temperatura, antes (dia 21), durante (dia 28) e após a primeira onda de calor (dia 35). As barras de erro indicam o desvio-padrão.

primeiro tratamento sempre menos activos que os do segundo. Nos restantes tratamentos apenas em “Primavera Normal” foram encontradas diferenças significativas no dia 28, que tal como foi referido anteriormente, foi o dia coincidente com o período da onda de calor e com o aumento de actividade entre os indivíduos submetidos à “Onda de calor 1” (**Gráfico 8**).

Também foram encontradas diferenças entre os grupos sujeitos a diferentes dietas (GLMM,  $F_{2,3.752}=15,297$ ,  $P<0,01$ ): os indivíduos carnívoros apresentaram maior actividade que os restantes ( $P<0,05$ ), que tiveram níveis de actividade semelhantes entre si ( $P<0,05$ ) (**Figura 9**).

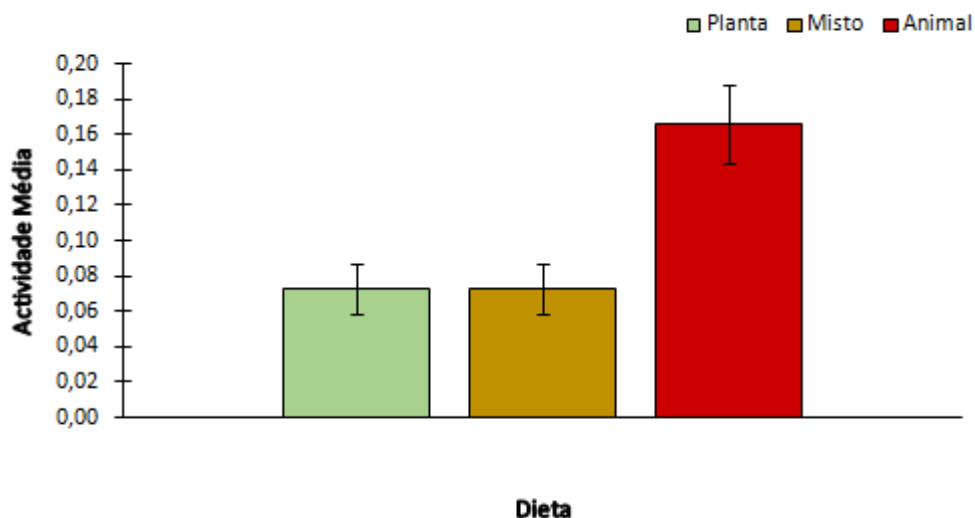


Figura 9 Actividade Média (probabilidade de um girino estar activo de cada vez que foi monitorizado) entre os consumidores de cada dieta. As barras de erro indicam o desvio-padrão.

### Comportamento antes, durante e após a segunda onda de calor

Não foram encontradas interações significativas entre temperatura e data (GLMM,  $F_{6,1.446}=0,9$ ,  $P=0,494$ ). Nas datas destas medições o tamanho da amostra era já muito reduzido, pois metade dos girinos já tinham sido sacrificados em todos os tratamentos (excepto os da "Onda de Calor 2") e muitos dos restantes já tinham chegado à metamorfose (incluído os do tratamento "Onda de Calor 2"), o que fez com que os

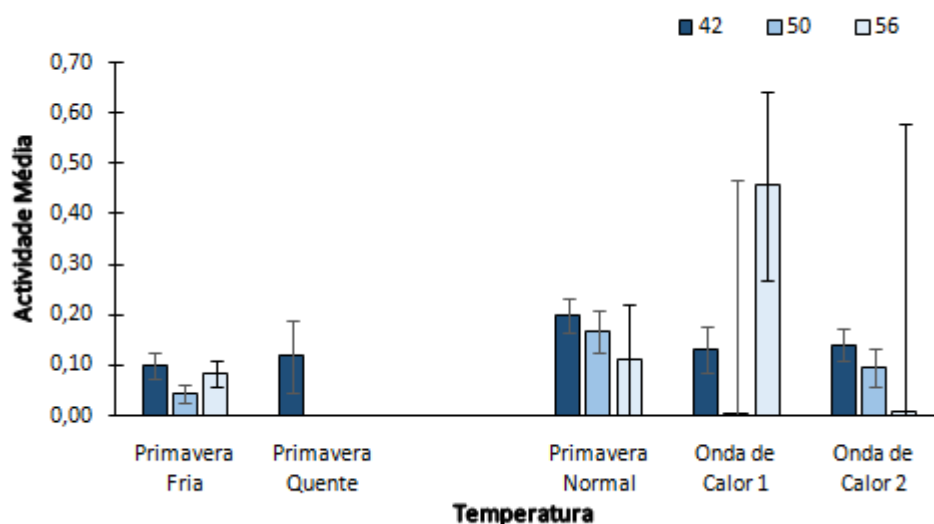


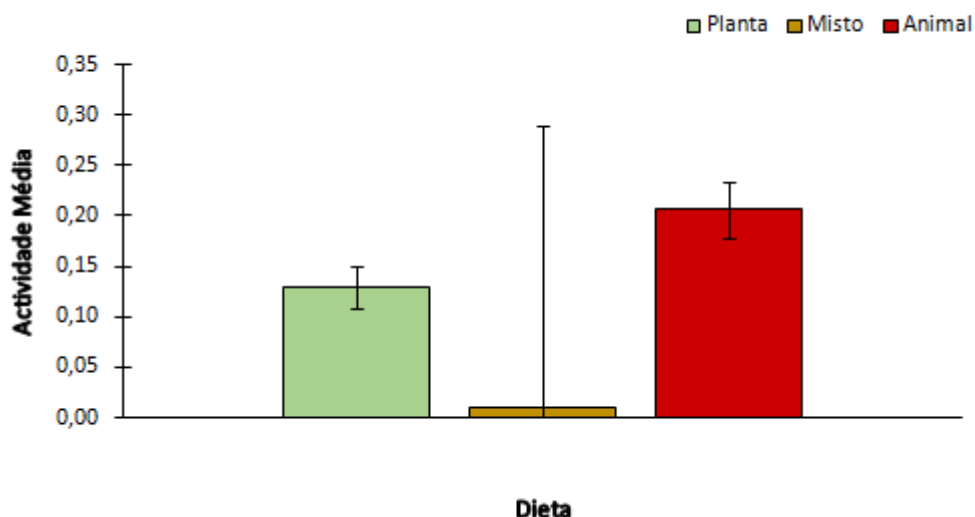
Figura 10 Actividade média (probabilidade de um girino estar activo de cada vez que foi monitorizado) dos girinos sujeitos aos vários regimes de temperatura, antes (dia 42), durante (dia 50) e após a segunda onda de calor (dia 56). As barras de erro indicam o desvio-padrão.

desvios padrão fossem muito elevados. Mesmo assim, pode-se referir que, à excepção dos girinos do tratamento "Onda de Calor 1", que estiveram mais activos no dia 56, os

girinos estiveram mais activos antes da segunda onda de calor (no dia 42), seguindo-se respectivamente os dias 50 e 56 (**Figura 10**).

Relativamente à temperatura não foram identificadas diferenças significativas entre os tratamentos (GLMM,  $F_{4,1.446}=1,252$ ,  $P=0,287$ ). É possível verificar graficamente que os indivíduos apresentaram uma actividade baixa e semelhante em todas as temperaturas, à excepção dos pertencentes aos tratamentos "Primavera Normal" e "Primavera Quente" onde a actividade foi ligeiramente superior (**Figura 10**).

Quanto à dieta foram encontradas diferenças significativas (GLMM,  $F_{2,1.446}=4,36$ ,  $P=0,013$ ). Observou-se que os indivíduos submetidos à dieta "Mista" praticamente não se movimentaram, enquanto os consumidores das dietas "Animal" e "Planta" obtiveram resultados semelhantes, com uma actividade média mais elevada. Não foram identificadas diferenças significativas nos testes *a posteriori* (**Figura 11**).



**Figura 11** Actividade média (probabilidade de um girino estar activo de cada vez que foi monitorizado) dos consumidores das várias dietas. As barras de erro indicam o desvio-padrão.

### Comprimento da cabeça dos girinos (dia 30)

Não foram encontradas interacções significativas entre temperatura e dieta (GLM,  $F_{6,127}=1,7753$ ,  $P=0,109$ ).

A análise indicou diferenças significativas entre os consumidores das diferentes dietas (GLM,  $F_{2,127}=5,3331$ ,  $P<0,01$ ). A dieta "Mista" foi aquela que originou os indivíduos com comprimentos maiores, enquanto a dieta "Animal" levou a indivíduos mais pequenos. O teste *a posteriori* (**Anexo 3**) indicou que a única diferença

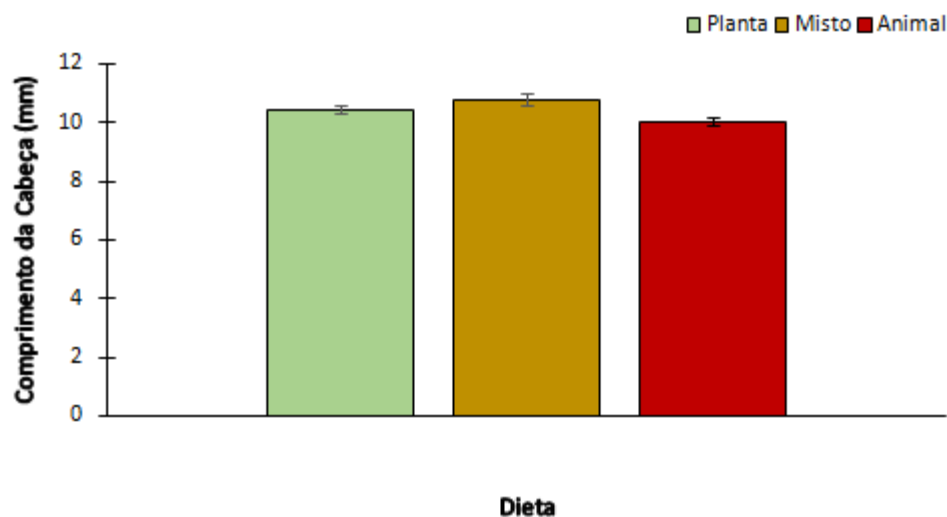


Figura 12 Comprimento médio da cabeça dos girinos a meio da experiência entre os vários grupos de dieta. As barras de erro indicam o desvio-padrão.

significativa ocorreu entre os indivíduos consumidores das dietas "Mista" e "Animal"(Figura 12).

Quanto à temperatura, a análise detectou diferenças significativas (GLM,  $F_{3,127}=26,469$ ,  $P<0,01$ ). Foi no regime de temperatura "Primavera Quente" que os indivíduos cresceram mais e em "Primavera Fria" que cresceram menos; já os indivíduos sujeitos a "Onda de Calor 1" e "Primavera Normal" obtiveram tamanhos semelhantes e intermédios entre os obtidos para os submetidos a "Primavera Quente" e "Primavera

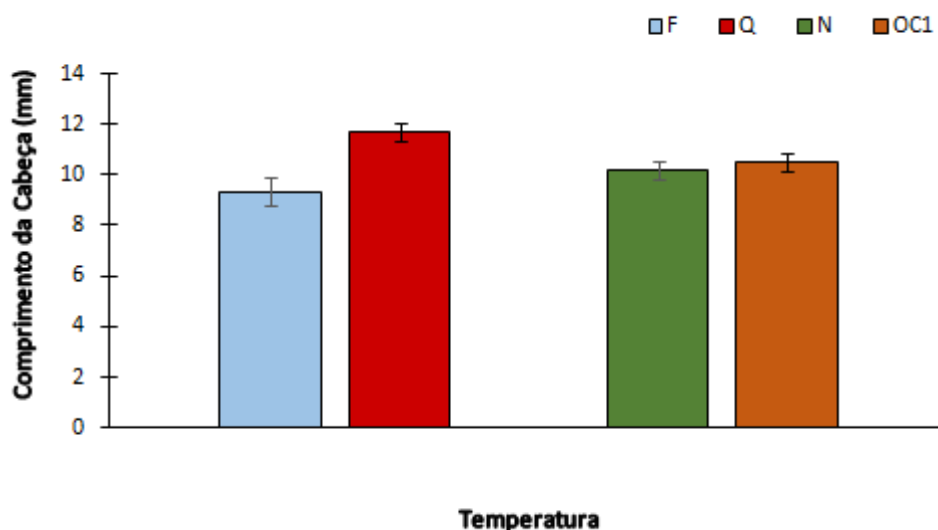


Figura 13 Comprimento médio da cabeça a meio da experiência entre os girinos pertencentes aos vários regimes de temperatura. As barras de erro indicam o desvio-padrão.



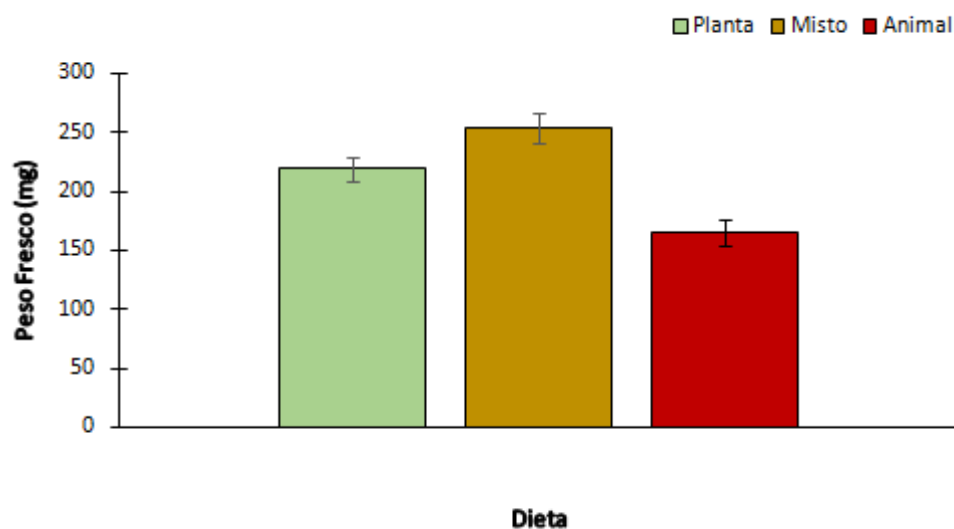
Fria". O teste *a posteriori* (**Anexo 2**) indicou que, à excepção da comparação entre os indivíduos "Onda de Calor 1" e "Primavera Normal", todas as diferenças foram significativas (**Figura 13**).

### Peso (dia 30)

---

Não houve interacção significativa entre temperatura e dieta (GLM,  $F_{6,135}=1,2629$ ,  $P=0,279$ ).

A dieta influenciou o peso (GLM,  $F_{2,135}=15,462$ ,  $P<0,01$ ). A análise gráfica revelou que o consumo da dieta "Animal" levou às médias de peso mais baixas, enquanto o consumo da dieta "Mista" levou ao desenvolvimento dos animais mais pesados; os consumidores de "Planta" apresentaram valores mais próximos aos registados entre os consumidores da dieta "Mista". O teste *a posteriori* (**Anexo 5**) identificou diferenças entre os consumidores da dieta "Animal" e os restantes (**Figura 14**).



**Figura 14** Peso médio a meio da experiência entre os girinos dos vários grupos de dieta. As barras de erro indicam o desvio-padrão.

A temperatura também provocou diferenças significativas no peso dos girinos (GLM,  $F_{3,135}=14,600$ ,  $P<0,01$ ). A exposição ao regime de temperatura "Primavera Quente" originou os girinos com os pesos médios mais elevados, acontecendo o oposto com os indivíduos do regime "Primavera Fria". Já "Onda de Calor 1" e "Primavera Normal" permitiram o desenvolvimento de indivíduos com pesos intermédios e semelhantes entre si (**Figura 15**).

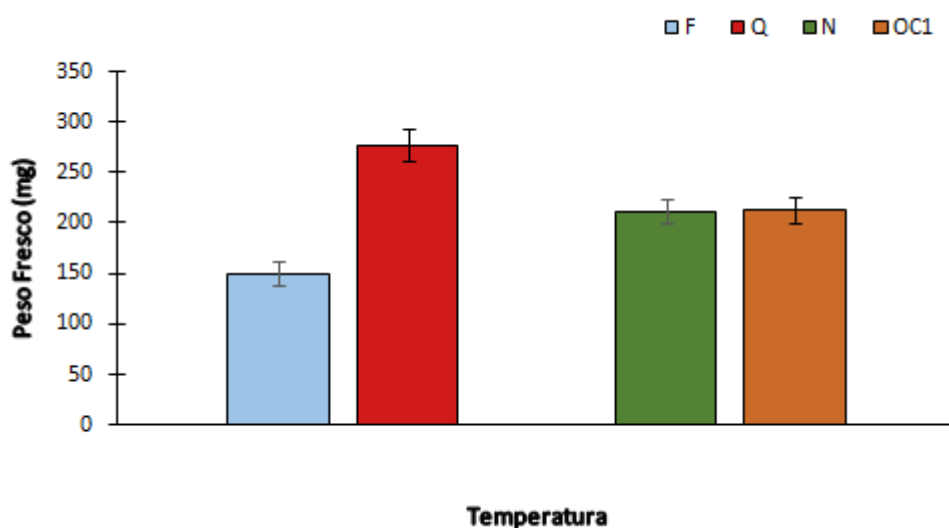


Figura 15 Peso Fresco médio a meio da experiência entre os girinos sujeitos aos vários regimes de temperatura. As barras de erro indicam o desvio-padrão.

O teste *a posteriori* (**Anexo 4**) revelou diferenças significativas entre as médias de peso dos indivíduos submetidos ao regime "Primavera Fria" e as dos restantes tratamentos ( $P < 0,05$  para todas as comparações).

### Estádios de desenvolvimento (Dia 30)

Não houve interacção entre temperatura e dieta (GLM,  $F_{6,135}=1,1601$ ,  $P=0,331$ ).

A dieta teve um efeito significativo no estágio larvar dos girinos no dia 30 (GLM,  $F_{2,135}=11,504$ ,  $P < 0,01$ ). A dieta "Mista" acelerou o desenvolvimento, enquanto a

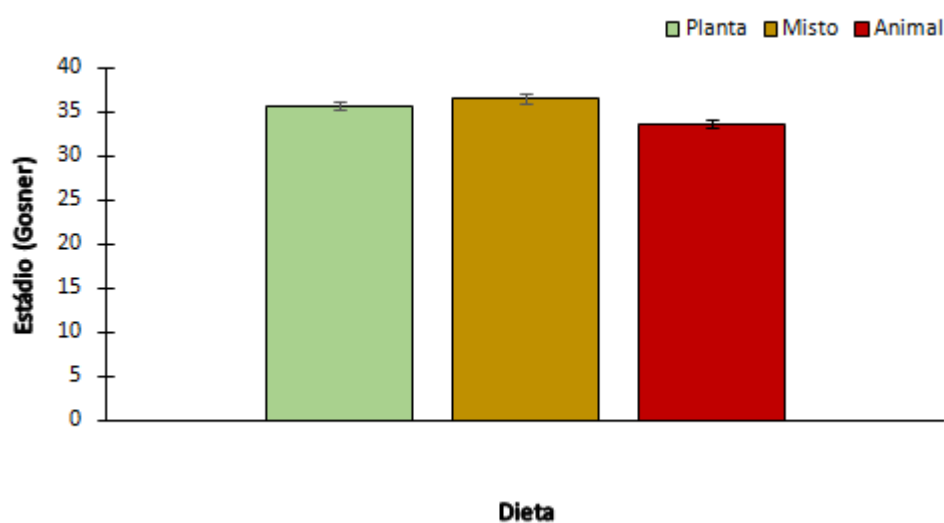


Figura 16 Estádio (Gosner) médio a meio da experiência entre os girinos dos vários grupos de dieta. As barras de erro indicam o desvio-padrão.

"Animal" foi a que mais retardou o desenvolvimento dos girinos; a dieta "Planta" provocou um aceleração do desenvolvimento semelhante ao ocorrido na dieta "Mista". O teste *a posteriori* (**Anexo 7**) revelou esta tendência (**Figura 16**).

Foram igualmente encontradas diferenças significativas causadas pelas diferentes temperaturas (GLM,  $F_{3,135}=39,080$ ,  $P<0,01$ ). A análise gráfica demonstrou os girinos se desenvolverem mais rapidamente em "Primavera Quente" e mais lentamente em "Primavera Fria". Em "Onda de calor 1" e "Primavera Normal" os girinos apresentaram um desenvolvimento intermédio e semelhante entre si. O teste *a posteriori* (**Anexo 6**) demonstrou a tendência anteriormente referida, ao indicar que apenas os valores obtidos para os indivíduos de "Onda de Calor 1" e "Primavera Normal" não diferiram significativamente ( $P<0,05$  para todas as outras comparações) (**Figura 17**).

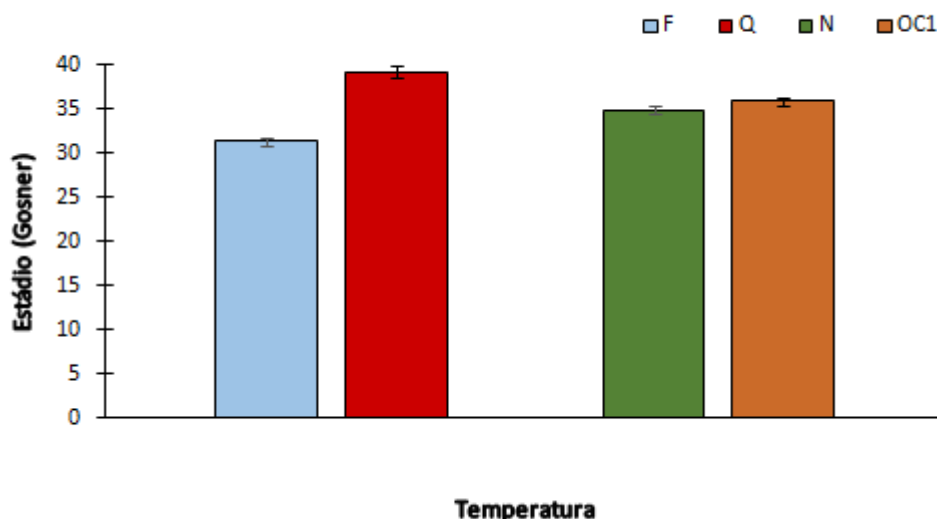


Figura 17 Estádio de desenvolvimento (Gosner) médio a meio da experiência entre os girinos dos vários regimes de temperatura. As barras de erro indicam o desvio-padrão.

## Período Larvar

Verificou-se a existência de uma interacção significativa entre temperatura e dieta (GLM,  $F_{8,191}=13,564$ ,  $P<0,01$ ). Na **Figura 18** é possível observar que houve grandes diferenças na duração do período larvar dos indivíduos dos tratamentos "Primavera Quente" e "Primavera Fria": em "Primavera Fria" ocorreram os períodos larvares mais longos e em "Primavera Quente" os mais curtos. Em "Primavera Fria", os indivíduos consumidores de "Planta" apresentaram um período larvar particularmente longo, em comparação com os consumidores das dietas "Animal" e "Mista". Em "Primavera Quente", os consumidores de "Mista" foram os que evidenciaram um período larvar mais curto seguindo-se, respectivamente, os consumidores de "Planta" e "Animal".

Quanto aos restantes tratamentos, observou-se que em "Onda de Calor 2" e "Primavera Normal" os resultados foram muito semelhantes em todas as dietas. Em "Onda de Calor 1", verificou-se uma redução do período larvar em todas as dietas, em comparação com "Onda de Calor 2" e "Primavera Normal". Nestes três últimos regimes de temperatura a dieta "Mista" foi aquela que levou aos menores períodos larvares, seguindo-se os consumidores de "Animal" e "Planta".

O teste *a posteriori* (**Anexo 13**) indicou que os períodos larvares dos girinos sujeitos à "Primavera Fria" foram significativamente diferentes dos de "Primavera Quente" em todas as dietas ( $P < 0,05$ ); em "Primavera Fria" os consumidores de "Planta" foram significativamente diferentes dos das restantes dietas; em "Primavera Quente" os consumidores de "Animal" divergiram significativamente dos da dieta "Mista".

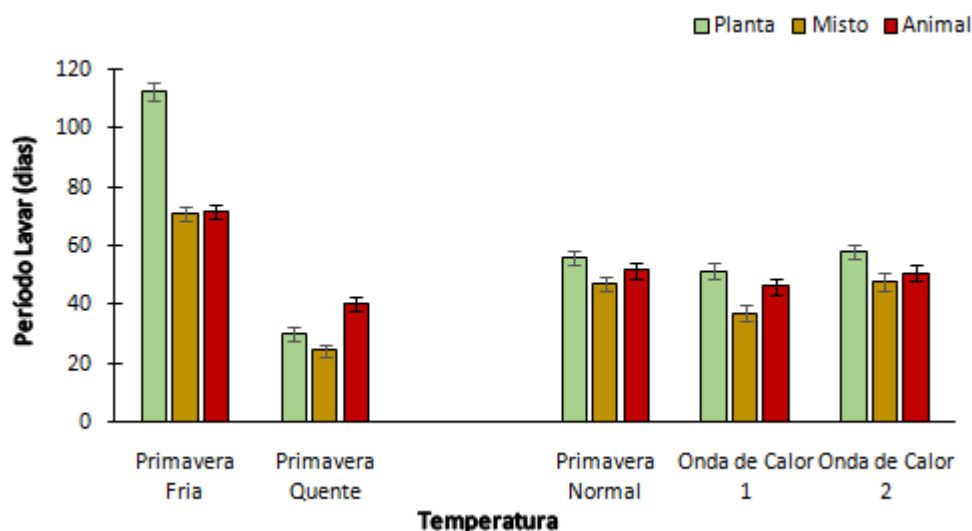


Figura 18 Interação entre os efeitos da temperatura e da dieta para a variável período larvar. As barras de erro indicam o desvio-padrão.

Quanto à dieta, de um modo geral os girinos que consumiram a dieta "Planta" apresentaram um período larvar mais longo enquanto os que consumiram a dieta "Mista" tiveram o período larvar mais reduzido.

Para a temperatura, os girinos dos regimes de temperatura "Primavera Fria" e "Primavera Quente" obtiveram resultados opostos; os primeiros obtiveram as médias mais elevadas de todos os tratamentos e os segundos as mais baixas. Nos restantes tratamentos, os girinos sujeitos a "Onda de Calor 2" e "Primavera normal" obtiveram resultados semelhantes, enquanto os pertencentes à "Onda de Calor 1" apresentaram médias ligeiramente mais baixas e significativamente diferentes de "Onda de Calor 2", o

que revela que só os primeiros responderam de forma inequívoca à onda de calor a que estiveram sujeitos.

### SVL dos recém-metamorfoseados

Não houve interações significativas entre temperatura e dieta (GLM,  $F_{8,172}=1,5512$ ,  $P=0,143$ ).

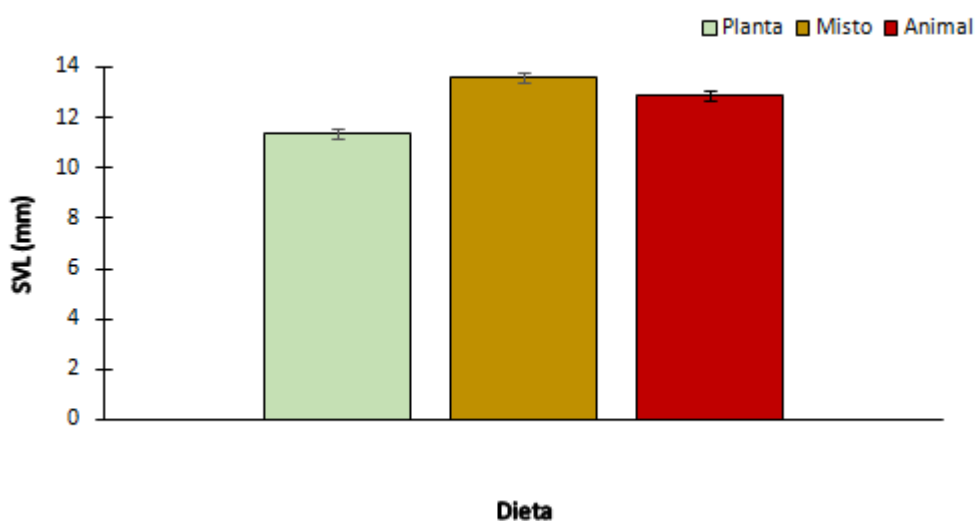
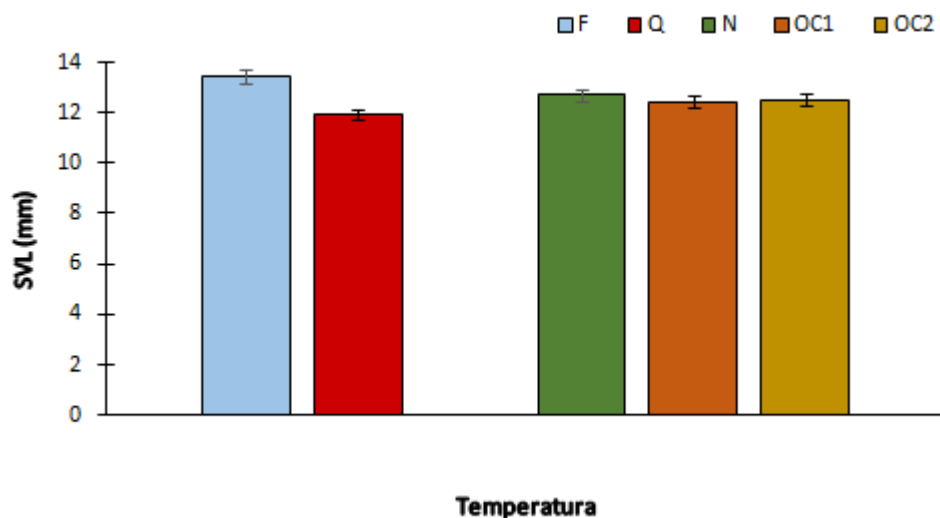


Figura 19 SVL médio entre os consumidores das várias dietas. As barras de erro indicam o desvio-padrão.

A análise identificou diferenças significativas entre os indivíduos das várias dietas (GLM,  $F_{2,172}=40,435$ ,  $P<0,01$ ). Os indivíduos da dieta "Mista" apresentaram o maior tamanho, seguindo-se os indivíduos submetidos às dietas "Animal" e "Planta". O teste *a posteriori* (**Anexo 9**) identificou diferenças significativas entre todas as comparações que envolveram a dieta "Planta" (**Figura 19**).

Foram igualmente encontradas diferenças significativas entre os indivíduos dos diferentes grupos de temperatura (GLM,  $F_{4,172}=5,5660$ ,  $P<0,01$ ). Os indivíduos de "Primavera Fria" obtiveram as médias de SVL mais elevadas de todos os tratamentos, enquanto os de "Primavera Quente" obtiveram as mais baixas. Os restantes tratamentos obtiveram resultados semelhantes entre si. O teste *a posteriori* (**Anexo 8**) detectou diferenças significativas entre os resultados para os indivíduos dos tratamentos de temperatura "Primavera Fria" e "Primavera Quente" ( $P<0,05$ ). Os girinos do primeiro tratamento divergiram significativamente dos girinos de ambas as ondas de calor, estas mais provocaram efeitos próximos daqueles verificados em "Primavera Quente",

enquanto os girinos do tratamento "Primavera Quente" divergiram significativamente dos do tratamento "Primavera Normal", mais próximos dos valores obtidos para os indivíduos de "Primavera Fria"(**Figura 20**).



**Figura 20** SVL entre os indivíduos dos vários regimes de temperatura. As barras de erro indicam o desvio-padrão.

## Peso dos recém-metamórficos

Foram encontradas interações significativas entre a temperatura e dieta (GLM,  $F_{8,167}=4,7343$ ,  $P<0,01$ ). A figura mostra que os girinos do tratamento "Primavera Fria" foram mais pesados em todas as dietas que os de "Primavera Quente"; contudo essas diferenças só foram significativas quando comparados os consumidores de "Planta" no frio com os consumidores de "Animal" e "Mista" no quente. Em "Primavera Fria", os indivíduos que registaram maior peso foram os consumidores da dieta "Animal" seguidos, respectivamente, pelos indivíduos submetidos às dietas "Mista" e "Planta", ao passo que em "Primavera Quente" não houve diferenças significativas entre as dietas. Nas restantes temperaturas os resultados foram semelhantes: os indivíduos mais pesados foram os consumidores da dieta "Mista" seguidos pelos da dieta "Animal" e "Planta"(**Anexo 14**) (**Figura 21**).

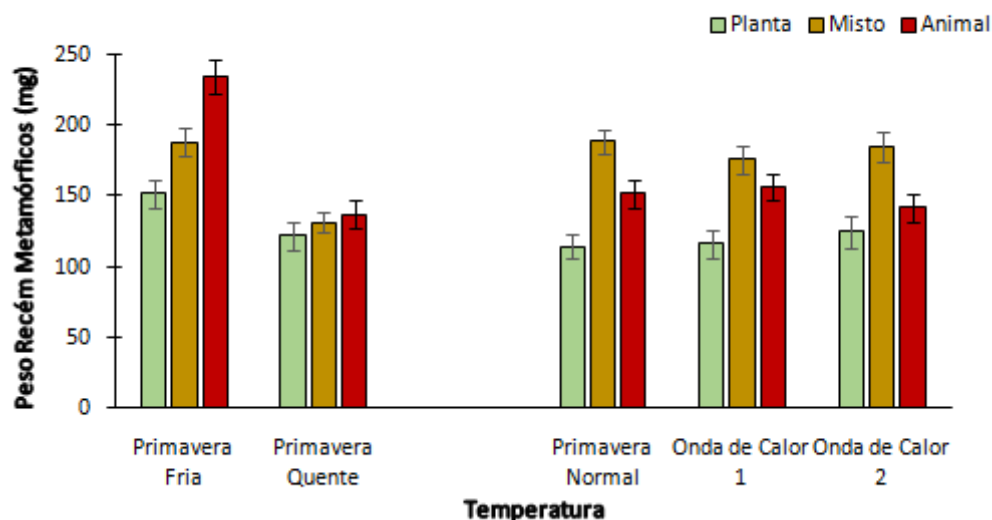


Figura 21 Interação entre os efeitos da temperatura e da dieta para a variável “peso dos recém-metamórficos”. As barras de erro indicam o desvio-padrão.

As diferenças foram significativas entre os girinos sujeitos às várias dietas. Os girinos consumidores de "Mista" obtiveram os pesos mais elevados; já os de "Animal" obtiveram pesos próximos de "Mista", ao passo que os de "Planta" obtiveram pesos menores (**Figura 20**).

Relativamente à temperatura, foram novamente encontradas diferenças significativas entre os membros de cada grupo. Os girinos sujeitos à temperatura "Primaveras Fria" obtiveram valores de peso muito superiores aos de "Primavera Quente", nas restantes temperaturas os resultados foram aproximados e intermédios aos obtidos para "Primavera Fria" e "Primavera Quente".

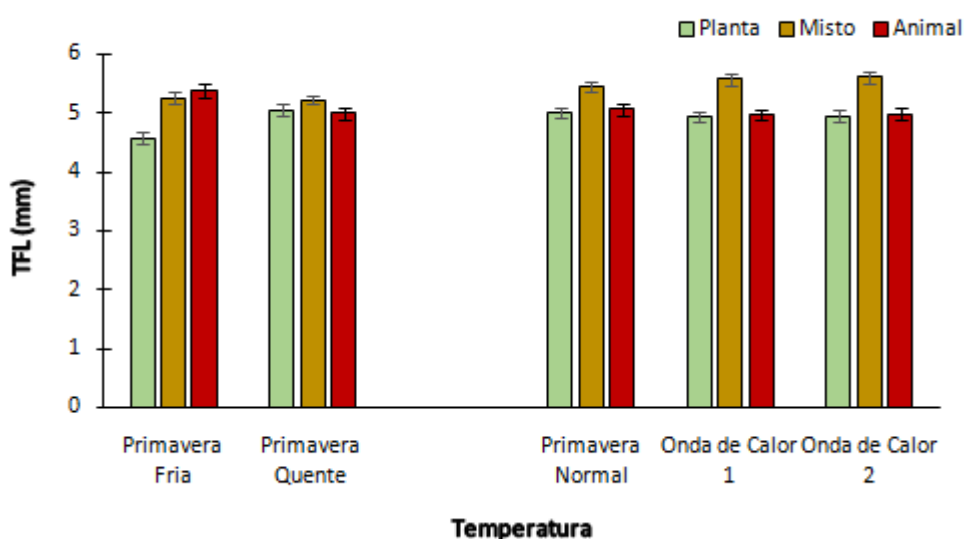
## TFL/SVL

Verificou-se a ocorrência de interações significativas entre a temperatura e a dieta (GLM,  $F_{8,174}=4,1493$   $p<0,01$ ).

O regime de temperatura "Primavera Fria" permitiu que os indivíduos formassem túbias bastante compridas em todas as dietas; entre estas houve um claro destaque dos indivíduos submetidos à dieta "Animal", que apresentaram as túbias mais compridas de toda a experiência. Para além disso, somente no regime "Primavera Fria" os girinos consumidores da dieta "Mista" apresentaram túbias menores que os consumidores de "Animal". Ainda nesta temperatura, a dieta "Planta" parece não ser muito eficaz, pois os

seus indivíduos apresentaram túbias significativamente menores que as verificadas nas restantes dietas. Em claro contraste com os anteriores estiveram os girinos de "Primavera Quente", que geraram túbias significativamente mais pequenas que as do frio em todas as dietas à excepção da dieta "Planta".

Nas restantes temperaturas houve um claro benefício no consumo da dieta "Mista", comparativamente com o consumo de "Planta". Este efeito foi mais expressivo nos tratamentos "Onda de Calor 2" e "Primavera Normal", pois aqui os consumidores de dieta "Mista" apresentaram túbias que ainda divergiram significativamente das apresentadas pelos consumidores de "Animal". Em "Onda de Calor 1" as túbias dos



**Figura 22** Interação entre os efeitos da temperatura e da dieta para a variável TFL. As barras de erro indicam o desvio-padrão.

consumidores de "Mista" foram menores e as dos consumidores de "Animal" foram grandes o suficiente para não divergir significativamente de nenhum dos consumidores de "Mista" das temperaturas intermédias (**Anexo 15**) (**Figura 22**).

Os consumidores da dieta "Mista" foram aqueles que apresentaram túbias mais compridas seguidos a longa distância pelos consumidos de "Animal" e "Planta", respectivamente. O teste *a posteriori* detectou diferenças significativas em todas as comparações ( $P < 0,05$ ).

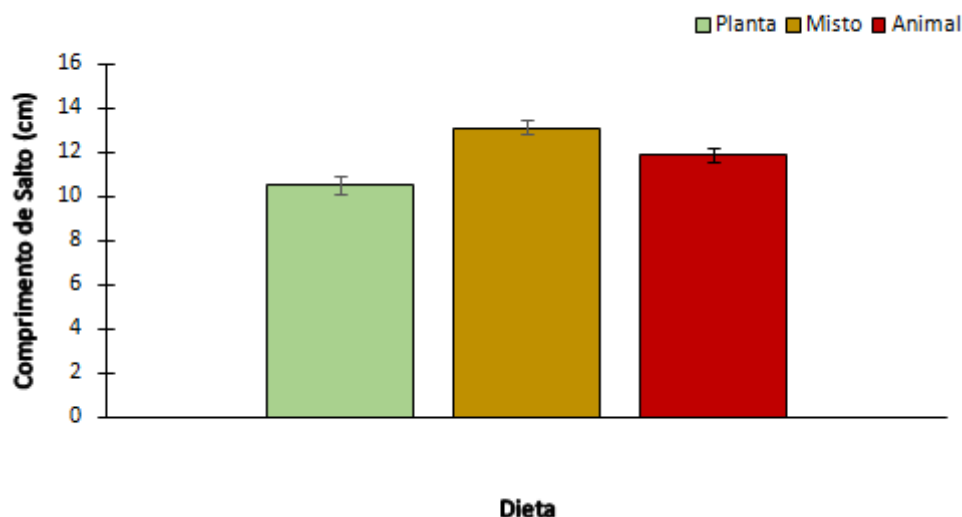
Não foram encontradas diferenças significativas entre os indivíduos pertencentes aos vários grupos de temperatura. Todavia, a análise gráfica revela que a média dos indivíduos de "Primavera Fria" é ligeiramente superior aos de "Primavera Quente". Os restantes tratamentos têm resultados semelhantes entre si.



## Saltos/TFL

Não foram identificadas interações significativas entre a temperatura e a dieta para o comprimento dos saltos, tendo em consideração o comprimento da tíbio-fíbula (GLM,  $F_{8, 148}=1,1856$ ,  $P=0,311$ ).

Para a dieta registaram-se diferenças significativas (GLM,  $F_{2,148}=9,8299$ ,  $P<0,01$ ). A dieta "Mista" permitiu aos seus consumidores realizarem saltos mais compridos; a segunda melhor dieta foi a "Animal" e a pior foi "Planta". O teste *a posteriori* (**Anexo 11**) detectou que todas as dietas são significativamente diferentes entre si ( $P<0,05$  para todas as comparações) (**Figura 23**).



**Figura 23** Comprimento de salto médio entre os consumidores das várias dietas. As barras de erro indicam o desvio-padrão.

Registaram-se diferenças significativas entre os indivíduos de grupos de temperatura diferentes (GLM,  $F_{4,148}=2,4625$ ,  $P=0,0477$ ). A análise gráfica demonstrou que os indivíduos da temperatura "Primavera Fria" realizaram saltos curtos quando comparados com os indivíduos dos restantes tratamentos, que apresentaram médias muito semelhantes. Contudo, o teste *a posteriori* (**Anexo 10**) não mostrou quaisquer diferenças significativas (**Figura 24**).

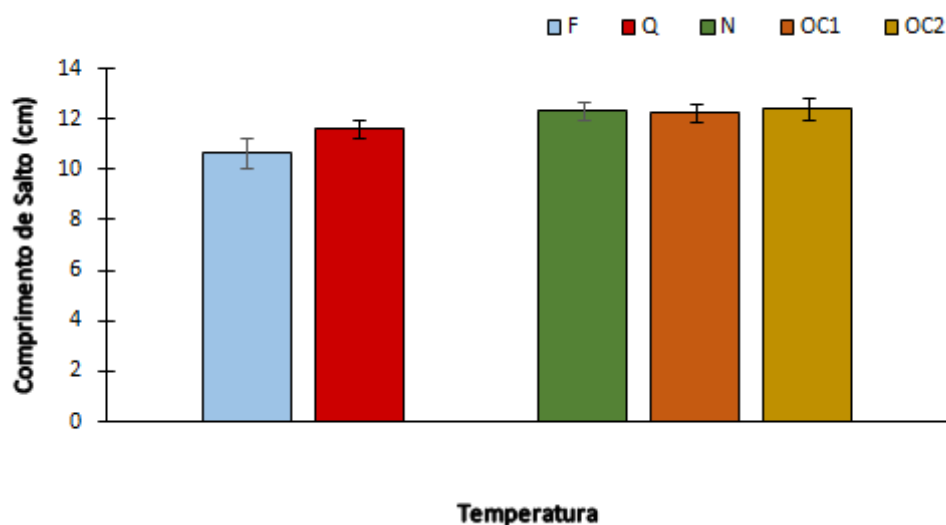


Figura 24 Comprimento de salto médio entre os indivíduos dos vários regimes de temperatura. As barras de erro indicam o desvio-padrão.

### Resistência/peso

Não se verificou a ocorrência de interações significativas entre a temperatura e dieta na resistência dos recém-metamorfoseados, tendo em consideração o seu peso (GLM,  $F_{3, 143}=1,1347$ ,  $P=0,344$ ). Verificou-se que os indivíduos da "Primavera Quente" apresentaram menor resistência que os da "Primavera Fria" em todas as dietas; contudo, possivelmente devido ao reduzido número de indivíduos de "Primavera Fria" que completaram a metamorfose, essas diferenças não foram significativas.

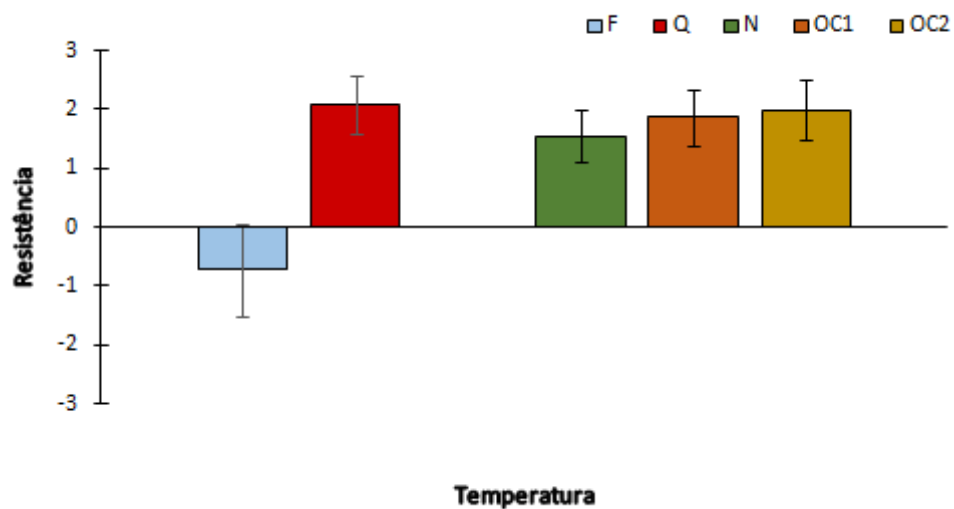
Nos tratamentos de temperaturas intermédias a generalidade dos resultados apontou para que as ondas de calor, principalmente a segunda, gerassem indivíduos com menor resistência.

Para a dietas as diferenças não foram significativas (GLM,  $F_{2,143}=0,0659$ ,  $P=0,936$ ), embora os consumidores de "Animal" apresentassem uma resistência ligeiramente inferior à dos consumidores de "Mista" e "Planta".

Foram encontradas diferenças significativas entre as médias dos indivíduos das diferentes temperaturas (GLM,  $F_{4,148}=2,4625$ ,  $P=0,04773$ ). A análise gráfica demonstra diferenças entre os indivíduos dos tratamentos de temperatura "Primavera Fria" e "Primavera Quente"; os primeiros foram quase significativamente mais resistentes que os segundos, contudo o reduzido número de indivíduos de "Primavera Fria" que chegou a realizar as duas sequências de saltos não permite tirar grandes conclusões. Apenas foram

registados valores para três indivíduos consumidores de "Planta" no regime de temperatura "Primavera Fria". Entre os restantes tratamentos os valores das médias foram muito semelhantes, sendo os indivíduos de "Primavera Normal" aqueles que apresentaram maior resistência (**Figura 25**).

O teste *a posteriori* (**Anexo 12**) corrobora a análise gráfica ao indicar que as diferenças entre os indivíduos de "Primavera Fria" e "Primavera Quente" estão muito próximas de serem significativas ( $P=0,057$ ). Os exemplares dos restantes tratamentos não diferiram entre si, sendo apenas de registar diferenças significativas entre os de "Onda de Calor 2" e "Primavera Fria", sendo os primeiros menos resistentes que os segundos.



**Figura 25** Resistência média entre os indivíduos sujeitos aos vários regimes de temperatura. As barras de erro indicam o desvio-padrão.

# Discussão

---

Este estudo detectou as diferenças já descritas entre os animais que se desenvolvem no frio e no calor (Álvarez e Nicieza, 2002a; Blaustein *et al.*, 2010). A temperaturas elevadas os animais desenvolveram-se muito rapidamente, mas com menos reservas energéticas que os dos restantes tratamentos, principalmente quando comparados com os que se desenvolveram no frio.

Verificou-se que na generalidade dos parâmetros analisados a dieta "Mista" foi aquela que permitiu aos seus consumidores atingirem os melhores resultados. Já a dieta "Vegetal" foi benéfica nos tratamentos que tiveram um desenvolvimento larvar mais acelerado (os da temperatura quente), o que se verificou logo a meio da experiência. Esta observação acaba por ir de encontro às previsões iniciais que estavam baseadas na assimilação de nutrientes mais rápida quando é consumida matéria vegetal.

Quanto à mortalidade, foi perceptível que quanto mais longo foi o período larvar, maior foi a probabilidade de um indivíduo não atingir a metamorfose. Os consumidores da dieta "Mista" foram os que morreram menos (em alguns tratamentos o número de mortes foi mesmo nulo), podendo esta ser a única dieta que permite aos girinos regular a quantidade e o tipo de nutrientes consumidos. Esta correlação positiva entre período larvar e mortalidade sugere também que esta espécie fica beneficiada com períodos larvares mais curtos, sendo isso um aspecto favorável no que diz respeito à sua capacidade de adaptação a contextos de aumento de temperatura.

O estudo detectou ainda alterações comportamentais resultantes das ondas de calor; todavia essas diferenças foram apenas significativas durante a primeira onda de calor. Em ambos os períodos de amostragem foi evidente que por norma os indivíduos mais activos foram os consumidores de dieta animal, principalmente os submetidos às temperaturas mais elevadas.

Ficou também demonstrado que a dieta mista foi aquela que favoreceu mais os indivíduos sujeitos às ondas de calor, pois esta permitiu que os seus consumidores antecipassem a sua metamorfose; todavia apenas para a primeira onda de calor esse efeito ficou demonstrado de uma forma evidente.

## Qual a melhor dieta a cada temperatura?

---

Os indivíduos sujeitos à temperatura “Primavera Quente” metamorfosearam-se mais depressa que todos os outros. Este aceleração era previsível, pois a natureza efémera do seu habitat natural e o efeito negativo que as temperaturas altas têm na sua duração, faz com que os indivíduos que não acelerem o seu desenvolvimento não o consigam concluir antes que os charcos sequem (Kupferberg, 1997; Álvarez e Nicieza, 2002a; Álvarez e Nicieza, 2002b). Para além disso, em todas as espécies de anfíbios o desenvolvimento larvar é acelerado pelo aumento de temperatura (Álvarez e Nicieza, 2002a), dada a relação positiva entre as taxas metabólicas e temperatura (Cook *et al.*, 2011).

De uma forma geral, o período larvar dos consumidores de dieta "Planta" e os de "Animal" foi semelhante. Contudo, tal como previsto, na "Primavera Quente" o período larvar médio dos indivíduos com dieta herbívora foi inferior ao dos carnívoros, o que pode ser devido à assimilação dos nutrientes desta dieta ser muito mais rápida em temperaturas mais elevadas.

Nos indivíduos consumidores de “Planta” submetidos a esta temperatura foi observado um comportamento alimentar único: um consumo rápido de todo o alimento, sem nunca deixar sobras, mesmo quando a quantidade de alimento oferecido foi aumentada. Como a falta de alimento não é um factor que possa ser colocado, já que a oferta deste foi aumentada até ao limite (quantidades demasiado elevadas poderiam por em causa a qualidade da água), parece verificar-se aqui uma preferência clara pelo alimento vegetal e como tal um investimento na quantidade de massa consumida que não se verificou nos carnívoros sujeitos à mesma temperatura.

O desenvolvimento mais acelerado nos indivíduos sujeitos à temperatura quente teve custos, que ficaram patentes por exemplo no peso após a metamorfose, onde os indivíduos submetidos ao frio apresentaram valores superiores, independentemente da dieta. De igual modo, a resistência dos recém-metamorfoseados foi muito menor nos indivíduos sujeitos às temperaturas quentes que nos sujeitos ao frio.

Tal como era esperado, os animais mantidos a temperaturas baixas metamorfosearam-se tardiamente e com maior peso, pois já foi referido por outros autores que em condições ambientais favoráveis os girinos prolongam o seu estágio

larvar para armazenarem mais reservas energéticas e desenvolverem um maior tamanho corporal à metamorfose (Álvarez e Nicieza, 2002a; Blaustein *et al.*, 2010; Rudolf e Singh, 2013). Sob esta temperatura, os indivíduos sujeitos à dieta "Animal" foram os mais pesados e, a par dos consumidores da dieta "Mista", os com menor período larvar. Não estando sujeitos a nenhuma pressão ambiental, os indivíduos tiraram partido dos nutrientes da dieta animal, que permite um maior desenvolvimento muscular e ósseo, e, consequentemente, um maior peso corporal (Álvarez e Nicieza, 2002a; Liess *et al.*, 2013). Nestas condições, a dieta animal será sempre a melhor pois a longo prazo os indivíduos podem atingir condições ideais para uma metamorfose mais rapidamente que os animais sujeitos a outras dietas, nutricionalmente mais pobres em nutrientes relevantes para o desenvolvimento corporal.

No entanto, o simples facto de permanecerem mais tempo durante a fase larvar pode ter como consequência um aumento da mortalidade. Tal como foi referido nos resultados, houve uma correlação positiva entre o período larvar e a mortalidade. Assim, tal como seria de esperar, e dado o seu período larvar mais longo, os indivíduos sujeitos à dieta vegetal sofreram uma mortalidade superior. Por outro lado, a mortalidade foi muito mais baixa no calor do que no frio. No calor não houve diferenças na mortalidade entre os animais sujeitos aos dois tipos de dieta.

Por último, existe ainda outro aspecto importante que marca as diferenças entre os consumidores das dietas "Planta" e "Animal": a capacidade de salto. Quanto ao comprimento dos maiores saltos e à resistência, não foram encontradas diferenças significativas entre os indivíduos, embora os consumidores de dieta "Animal" tenham apresentado resultados ligeiramente melhores. Contudo, o número de indivíduos que se metamorfoseou em condições de efectuar os testes de salto diferiu bastante. Apenas 3 consumidores de "Planta" no regime de temperatura "Primavera Fria" conseguiram efectuar os testes de salto, tendo os restantes morrido após a reabsorção da cauda, ou realizado a metamorfose num estado tão frágil que não saltaram. Este fenómeno ocorreu apenas nos animais herbívoros e demonstra uma vantagem inequívoca da dieta carnívora numa temperatura fria.

Se analisarmos os saltos separadamente para a dieta e a temperatura verificamos que influenciaram aspectos diferentes. A dieta influenciou o comprimento máximo dos saltos, sendo os submetidos à dieta "Planta" os que saltaram distância mais curtas. Isto

seria expectável devido à importância da proteína animal na formação óssea e muscular (Kupferberg, 1997; Liess *et al.*, 2013). Por outro lado, a temperatura influenciou a resistência dos recém-metamorfoseados, que foi maior nos indivíduos sujeitos ao frio (e, portanto, com maior tamanho), o que faz sentido devido às sua maior massa corporal, que indica mais reservas energéticas.

Concluindo, no frio a carnivoria foi claramente melhor do que a herbivoria. Já no quente, apesar de alguns resultados, como os do período larvar e peso após a metamorfose, sugerirem que a herbívora é a melhor dieta, essa superioridade não foi evidenciada de uma maneira inequívoca.

### **Houve escolha da dieta ideal nos indivíduos submetidos a uma dieta mista?**

---

Em todos os tratamentos foi notório que animais sujeitos à dieta "Mista" terão racionado a quantidade de matéria animal e vegetal consumida em função da temperatura. Por norma os indivíduos submetidos a esta dieta obtiveram os melhores resultados, ou resultados próximos de serem os melhores, nos vários parâmetros analisados.

Ao nível da mortalidade ficaram espelhados de forma inequívoca os benefícios da dieta "Mista" e da possibilidade de escolha para girinos. Se em "Primavera Fria" os consumidores da dieta "Mista" apresentaram percentagens de mortalidade muito semelhantes às dos indivíduos das restantes dietas, em "Primavera Quente" e "Primavera Normal" a diferença foi clara não tendo sido registada qualquer morte em ambas para os consumidores da mesma dieta.

A existência de uma mortalidade maior nos animais sujeitos a uma dieta mista na "Primavera Fria" poderá advir de duas razões distintas: i) a correlação entre período larvar e percentagem de mortalidade indicou que quanto maior fosse o período larvar maior seria a mortalidade, logo o prolongamento desse período registado nesta temperatura pode ter contribuído para atenuar os efeitos positivos da dieta "Mista"; ii) por outro lado, esta temperatura não exerceu pressões tão fortes para o desenvolvimento larvar como as outras, e este aspecto pode ter contribuído para aproximar os resultados dos consumidores das várias dietas.

Em "Primavera Quente" as percentagens de mortalidade nos estádios larvares foram muito reduzidas. Neste tratamento a pressão para uma metamorfose rápida era muito grande, como tal era exigido que a escolha alimentar permitisse acelerar o desenvolvimento. Essa resposta foi muito eficiente, pois apesar de nesta temperatura os indivíduos das outras dietas apresentarem uma percentagem de mortalidade reduzida (6,7%), os consumidores da dieta "Mista" metamorfosearam-se mais rapidamente que os restantes e sem que tal fosse prejudicial para a sua sobrevivência (a mortalidade foi nula).

Em "Primavera Normal" os resultados foram ainda mais interessantes pois as diferenças entre as percentagens de mortalidade dos indivíduos foi notória. Enquanto os consumidores de "Animal" e "Planta" obtiveram, respectivamente, mortalidades de 18,8% e 6,7% os indivíduos consumidores de "Mista" não registaram qualquer morte. É então notório que só esta dieta, e a possibilidade de escolha que aufer, permite aos girinos incrementarem a sua probabilidade de sobrevivência. Outro aspecto relevante é que este regime de temperatura e dieta é o mais aproximado do que seria uma situação "teórica" normal em termos de condições climáticas e disponibilidade de alimentos, e por isso este resultado já era de certo modo esperado.

Quanto ao período larvar, a interacção significativa entre a temperatura e a dieta veio corroborar as previsões iniciais. Ao terem sido em todos os regimes de temperatura os consumidores de dieta "Mista" a ter os períodos larvares mais curtos, fica demonstrado que em condições ambientais distintas os indivíduos regularam o conteúdo nutricional ingerido, adaptando-o às diferentes condições.

Entre os indivíduos sujeitos à "Primavera Fria" verificaram-se períodos larvares praticamente idênticos entre os consumidores de dieta "Mista" e "Animal", o que não havia sido observado em mais nenhuma temperatura. Tal como foi verificado em outras variáveis, a dieta carnívora é muito vantajosa nestas condições ambientais, e como tal os indivíduos sujeitos à dieta "Mista" poderão ter apostado mais neste tipo de alimento, pois não lhes foram dados sinais que os fizessem apostar num aceleração da sua metamorfose. Deste modo o consumo da dieta mais rica em energia a longo prazo, a carnívora, parece ter sido adoptado, e bem, pelos consumidores de dieta "Mista".



Sob a temperatura "Primavera Quente" o período larvar foi significativamente diferente entre os indivíduos submetidos às dietas "Mista" e "Animal". Este aspecto é relevante, pois num contexto onde o mais importante é atingir a metamorfose rapidamente a dieta "Mista" foi melhor do que a dieta "Animal" mas igual à dieta "Planta", suportando a hipótese de que o consumo de matéria vegetal nestas condições é vantajoso. Para além disso, sendo nesta temperatura os animais sujeitos à dieta "Mista" os que apresentaram menor período larvar, e simultaneamente os maiores tamanhos, há uma forte indicação de que regularam eficientemente a sua dieta.

Quanto ao peso, foi notório que uma alimentação que englobasse apenas uma dieta vegetal não permitiu que os girinos obtivessem pesos elevados após a metamorfose. A diferença entre os pesos dos consumidores das várias dietas seria teoricamente maior quanto maior fosse o período larvar, uma vez que quanto maior este período, melhor os girinos poderiam aproveitar o conteúdo energético da dieta carnívora. Na prática foi isso que acabou por acontecer. Em "Primavera Quente" as diferenças não foram significativas; no entanto nas outras temperaturas essas diferenças já o foram, sendo especialmente expressivas entre os indivíduos do regime de temperatura "Primavera Fria".

Olhando isoladamente para os indivíduos do regime "Primavera Fria" é de ressaltar que os indivíduos com dieta carnívora apresentaram resultados muito semelhantes aos de dieta "Mista". Este resultado poderá ser uma consequência de um tratamento de temperatura que não coloca qualquer tipo de pressão para uma metamorfose rápida; deste modo, ao complementarem a sua dieta com alimentos de origem vegetal, os indivíduos da dieta "Mista" poderão ter saído penalizados. Contudo, esta diferença não foi significativa.

Verificaram-se diferenças significativas entre os consumidores das várias dietas sob a temperatura "Primavera Normal". Estes resultados foram bastante interessantes pois demonstraram que na temperatura mais próxima da "normal" em meio natural a dieta "Mista" é a mais vantajosa para a obtenção de reservas energéticas. Os consumidores desta dieta puderam aproveitar os benefícios das duas dietas. O período larvar muito reduzido, comparativamente aos animais sujeitos a "Primavera Fria", deverá

ter sido o factor fundamental que levou a que os indivíduos sujeitos à dieta "Mista" fossem significativamente mais pesados que os de "Animal", ao contrário do que aconteceu no frio.

De um modo geral é possível concluir que quanto mais fria for a temperatura menor será a pressão para se realizar uma metamorfose rápida e desse modo o período larvar será maior. Quanto maior for o período larvar maior será a mortalidade antes da metamorfose, mas ao mesmo tempo as reservas energéticas também serão maiores, contribuindo assim para aumentar o *fitness* na fase juvenil. De modo inverso, quando a temperatura é muito elevada, é do interesse dos indivíduos metamorfosearem-se mais depressa em detrimento de aumentarem as suas reservas energéticas, e como tal vão apostar mais na matéria vegetal, que tem uma assimilação mais facilitada. Apesar de a mortalidade ser nula entre os consumidores de dieta "Mista" e muito reduzida nos restantes, as médias baixas de peso podem diminuir as suas possibilidades de sobrevivência na fase juvenil.

Quando o regime de temperatura é mais aproximado ao que seriam as condições ambientais normais a dieta "Mista" surge novamente como a melhor, permitindo aos seus consumidores terem pesos significativamente maiores e um período larvar reduzido. Ao mesmo tempo a mortalidade destes indivíduos foi nula. O consumo de matéria animal parece aumentar as reservas e diminuir o período larvar mas aumenta a probabilidade de mortalidade nos estádios larvares.

## **Efeitos das ondas de calor**

---

A mortalidade foi diferente nos indivíduos submetidos às duas ondas de calor.

Todavia estas têm um factor comum que está de acordo com as expectativas iniciais. A mortalidade foi superior entre os consumidores das várias dietas comparativamente com os seus equivalentes submetidos ao regime de temperatura "Primavera Normal" (com a única excepção dos consumidores de "Planta" em "Onda de Calor 2", cuja explicação vai ser abordada mais à frente). Tal era expectável pois uma onda de calor é um factor de stress elevado e para o qual nem todos os indivíduos podem estar preparados.

Quanto à mortalidade em "Onda de Calor 1", esta foi muito superior nos consumidores de "Animal" comparativamente às restantes dietas. Estes resultados valorizam, assim, o consumo de matéria vegetal como uma melhor resposta à onda de calor e vão de encontro às expectativas para esta temperatura.

Já os girinos dos tratamentos de "Onda de Calor 2" sofreram mortalidades mais elevadas quando submetidos à dieta "Planta", seguindo-se os indivíduos das dietas "Animal" e "Mista". No entanto, grande parte da mortalidade dos girinos consumidores de "Planta" ocorreu antes da própria "Onda de Calor 2", e portanto não pode ser relacionada com este factor de stress.

Quanto ao comportamento, apenas foram encontradas interações entre a temperatura e data em "Onda de Calor 1". Neste regime de temperatura é notório um aumento de actividade durante a onda de calor que chega a ser equiparável aos níveis de actividade dos indivíduos de "Primavera Quente". Esta resposta revela uma alteração comportamental relevante.

Os resultados em "Onda de Calor 2" poderão não ter sido significativos pois a fase tardia em que esta onda de calor foi implementada não provocou um choque térmico tão intenso.

A análise dos estádios larvares após a onda de calor a que os indivíduos de "Onda de calor 1" foram sujeitos demonstrou que esta não causou efeitos imediatos e significativos nos estádios larvares dos girinos das várias dietas. As consequências dessa onda de calor só viriam a ser visíveis mais tarde, tal como ficou patente na análise do período larvar.

Na análise ao período larvar após a metamorfose foi perceptível um decréscimo dos períodos larvares dos indivíduos sujeitos a todas as dietas comparativamente aos do regime de temperatura "Primavera Normal"; todavia só significativo nas comparações dos indivíduos de dieta "Mista" de "Onda de Calor 1" com os consumidores de "Planta" e "Animal" de "Primavera Normal". Apesar da onda de calor não ter sido suficientemente forte para que os consumidores da dieta "Mista" registassem um período larvar inferior aos consumidores da mesma dieta em "Primavera Normal" e

"Onda e Calor 2", fica patente que estes são os que apresentam resultados mais próximos aos registados na temperatura "Primavera Quente". Fica assim indicado um dos efeitos esperados desta onda de calor e dos benefícios da dieta "Mista" e da possibilidade de escolha e regulação nutricional que esta oferece aos seus consumidores, pois só o consumo desta dieta permitiu mitigar de forma satisfatória os efeitos negativos de uma onda de calor.

Os resultados para o peso após a metamorfose não corresponderam às expectativas para os indivíduos de "Onda de Calor 1". Estes foram muito semelhantes nas várias dietas, sendo os indivíduos com dieta herbívora os únicos a diferir significativamente, e pela negativa, dos restantes.

Todavia, a "Onda de Calor 1" deveria ter exercido um efeito significativo que diferenciase positivamente o peso dos indivíduos dos consumidores da dieta "Mista" dos restantes, pois o acesso a alimentação de origem vegetal deveria beneficiá-los nestas condições. Da mesma maneira não seria suposto que num contexto de um forte aumento da temperatura os indivíduos da dieta "Planta" fossem significativamente mais leves que os restantes. Estas suposições baseiam-se na mesma linha de pensamento que foi argumentada anteriormente para os animais sujeitos a temperaturas quentes, ou seja, que quando são exercidas pressões para os animais se desenvolvam mais rapidamente, o consumo de matéria vegetal é o mais favorável.

Os pesos à metamorfose dos indivíduos de "Onda de Calor 2" foram muito semelhantes aos da primeira onda de calor. Apenas há a registar que os consumidores de dieta "Mista" apresentaram pesos significativamente maiores que os de dieta "Animal" e "Planta"; todavia esse resultado deveu-se mais a um decréscimo do peso nos consumidores de "Animal" nesta temperatura do que a um aumento do peso nos consumidores de "Mista" comparativamente aos homólogos de "Onda de Calor 1". Estes resultados encontram-se novamente próximos dos de "Primavera Normal", o que era suposto devido ao estado avançado de desenvolvimento dos indivíduos aquando a segunda onda de calor

Deste modo, podemos assumir que uma onda de calor numa fase inicial do desenvolvimento causa efeitos negativos ao nível da mortalidade, um aumento de actividade e um aceleração do desenvolvimento larvar quando existe a possibilidade

de escolha na alimentação. Apesar da mortalidade ter aumentado com as ondas de calor é possível referir que esta espécie tem alguma resiliência para estes tipo de fenómenos, pois para além de não terem sido encontradas diferenças de maior ao nível do peso à metamorfose entre os dois regimes que englobavam ondas de calor e o regime "Primavera Normal", esta espécie revelou ter capacidade de acelerar o seu desenvolvimento larvar em "Onda de Calor 1". O aceleração do desenvolvimento larvar será sempre o factor mais importante, pois em habitats efémeros a capacidade de os girinos se metamorfosearem é um factor determinante para o seu *fitness* (Kupferberg, 1997; Álvarez e Nicieza, 2002a; Álvarez e Nicieza, 2002b).

## Conclusões

---

Ficou demonstrado que, à excepção dos indivíduos sujeitos ao regime "Primavera Fria", a disponibilidade de alimentos de origem animal e vegetal é determinante para o sucesso desta espécie em qualquer situação climática, e que a ausência de um destes tipos de alimento pode mesmo reduzir de forma drástica as suas possibilidades de sobrevivência (p. ex: consumo estrito de planta no frio; consumo estrito de alimentos de origem animal no calor). Para além disso os consumidores da dieta mista só não atingiram os maiores pesos no frio.

Ficou ainda demonstrado que os indivíduos revelaram capacidade de resposta às alterações de temperatura na maioria dos parâmetros analisados, respondendo diversas vezes com alterações na sua dieta. Todavia, os resultados verificados para as ondas de calor não foram tão evidentes quanto o esperado, muito provavelmente devido à capacidade de adaptação da espécie.

Deste modo foi possível concluir que esta espécie poderá apresentar alguma resiliência às alterações climáticas na península Ibérica. Contudo, é recomendada uma monitorização regular das várias populações e dos seus habitats, pois em anos muito quentes a disponibilidade de alimento pode ser um factor relevante no aumento da fragilidade das populações.

Apesar de estes resultados serem positivos no que diz respeito à conservação desta espécie, seria relevante realizar estudos semelhantes em populações do norte e centro da Europa, pois o facto de as populações ibéricas viverem há muito tempo em habitats quentes e muito variáveis como os mediterrânicos pode ter permitido que se

diferenciassem geneticamente, e deste modo estarem mais preparadas para fazer frente a alterações no seu ambiente térmico.

# Referências Bibliográficas

---

- [IUCN] International Union for Conservation of Nature. (2015). The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Downloaded on 24 February 2015
- Altig, R., Whiles, M., Taylor, C. (2007). What tadpoles really eat? Assessing the trophic status of an understudied and imperiled group of consumers in freshwater habitats. *Freshwater Biology* **52**, 386–395
- Álvarez, D., Nicieza, G. (2002a). Effects of temperature and food quality on anuran larval growth and metamorphosis. *Functional Ecology* **16**, 640–648
- Álvarez, D., Nicieza, G. (2002b). Effects of induced variation in anuran larval development on postmetamorphic energy reserves and locomotion. *Oecologia* **131**, 186–195
- Alves, S. G. (2008). Estudo das respostas anti-predatórias das duas espécies europeias de rãs – *Hyla arborea* (L., 1758) e *Hyla meridionalis* (Boettger, 1874) na presença de um predador exótico e de um autóctone. Faculdade de Ciências Universidade de Lisboa, Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Biologia da Conservação
- Araújo, M., Thuiller, W., Pearson, R. (2006). Climate warming and the decline of amphibians and reptiles in Europe. *Journal of Biogeography* **33**, 1712–1728
- Arnold, E. N., Ovenden, D. (2004). A field guide to the reptiles and amphibians of Britain and Europe. Collins
- Baker, N., Bancroft, B., Garcia, T. (2013). A meta-analysis of the effects of pesticides and fertilizers on survival and growth of amphibians. *Science of The Total Environment* **449**, 150–156
- Bancroft, B., Baker, N., Blaustein, A. (2007). A meta-analysis of the effects of ultraviolet B radiation and its synergistic interactions with pH, contaminants, and disease on amphibian survival. *Conservation Biology* **22**, 987–996

- Barbadillo, L. J.; Lacomba, J. I.; Pérez-Mellado, V.; Sancho, V. e López-Jurado, L. F. (1999). Anfibios y reptiles de la Peninsula Iberica, Baleares y Canarias. Barcelona: Editorial Planeta, S. A.
- Beebee, T., Griffiths, R. (2005). The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology?. *Biological Conservation* **125**, 271-285
- Beniston, M., Stephenson, D. (2004). Extreme climatic events and their evolution under changing climatic conditions. *Global and Planetary Change* **44**, 1-9
- Bernstein, L., Bosch, P., Canziani, O., Chen, Z., Christ, R., Davidson, O. (2007). Climate change 2007: synthesis report. Summary for policymakers. Geneva, IPCC, Pp 47
- Blaustein, A. (1994b). Chicken little or Nero's fiddle? A prespective on declining amphibian populations. *Herpetologica* **50**, 85-97
- Blaustein, A. R., Romansic, J. M., Kiesecker, J. M. (2003). Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. *Diversity and Distributions* **9**, 123-140
- Blaustein, A. R., Walls, S. C., Bancroft, B. A., Lawler, J. J., Searle, C. L., Gervasi, S. S. (2010). Direct and Indirect Effects of Climate Change on Amphibian Populations. *Diversity* **2**, 281-313
- Blaustein, A., Belden, L., Olson, D., Green, D., Root, T, Kiesecker (2001). Amphibian breeding and climate change. *Conservation Biology* **15**, 1804-1809
- Blaustein, A., Wake, D., Sousa, W. (1994a). Amphibian declines: judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extintions. *Conservation Biology* **8**, 60-71
- Blaustein, L., Garb, J., Shebitz, D., Nevo, E. (1999). Microclimate, developmental plasticity and community structure in artificial temporary pools. *Hydrobiologia* **392**, 187–196
- Buck, J., Scheessele, E., Relyea, R., Blaustein, A. (2012). The effects of multiple stressors on wetland communities: pesticides, pathogens and competing amphibians. *Freshwater Biology* **57**, 61-73



- Burrowes, P. A., Joglar, R. L., Green, D. E. (2004). Potential Causes for Amphibian Declines in Puerto Rico. *Herpetologica* **60**, 141-154
- Carey, C, Alexander, M. (2003). Climate Change and amphibian declines: is there a link? *Diversity and Distributions* **9**, 111-121
- Carretero, M. A., Sequeira, F., Gonçalves, H., Soares, C., Teixeira, J., Sillero, N. and Ferrand, N. (2003). Anfíbios e Répteis do Sítio “ Natura 2000” Alvão-Marão, Distribuição e Conservação. IUCN
- Carvalho, S., Brito, J., Crespo, E. (2014). From climate change predictions to actions - conserving vulnerable animal groups in hotspots at a regional scale. *Global Change Biology* **16**, 3257-3270
- Collins, J. P., Storfer, A. (2003). Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and Distributions* **9**, 89-98
- Colon-Gaud, C., Whiles, M., Brenes, R., Kilham, S., Lips, K., Pringle, C., Connelly, S., Peterson, S. (2010). Potential functional redundancy and resource facilitation between tadpoles and insect grazers in tropical headwater streams. *Freshwater Biology* **55**, 2077–2088.
- Cook, S., Eubanks, M., Gold, R., Behmer, S. (2011). Seasonality Directs Contrasting Food Collection Behavior and Nutrient Regulation Strategies in Ants. *PLoS ONE* **6**, 25407.
- Corssland, M., Shine, R. (2011). Cues for cannibalism: cane toad tadpoles use chemical signals to locate and consume conspecific eggs. *Oikos* **120**, 327-332
- Costa, C. (2011). Factores que condicionam a dispersão e o recrutamenyo da camarinha em sistemas dunares. Faculdade de Ciências Universidade de Lisboa, dissertação de Mestrado em Biologia da Conservação
- Costa, Z., Vonesh, J. (2013). Interspecific differences in the direct and indiredt effects of two neotropical hylid tadpoldes on primary producers and zooplankton. *Biotropica*, **45**, 503-510
- Crump, M. (1983). Opportunistic cannibalism by amphibian larvae in temporary aquatic environments. *American Naturalist* **121**, 281-287

- Crump, M. (1990). Possible enhancement of growth in tadpoles through cannibalism. *Copeia*, 560–564
- Daszak, P., Berger, L., Cunningham, A. A., Hyatt, A. D., Green, D. E., Speare, R. (1999). Emerging Infectious Diseases and Amphibian Population Declines. *Emerging Infectious Diseases* **5**, 735-748
- Della-Marta, P., Haylock, M., Luterbacher, J., Wanner, H. (2007). Doubled length of western European summer heat waves since 1880. *Journal of Geophysical Research* **112**, D15103
- Duellman, W., Trueb, L. (1986). *Biology of Amphibians*. McGraw Hill Book Co, New York, NY
- Fischer, E. M., Schär, C. (2010). Consistent geographical patterns of changes in high-impact European heatwaves. *Nature Geoscience* **3**, 398–403
- Frich, P., L. V. Alexander, P. Della-Marta, B. Gleason, M. Haylock, A. M. G. Klein Tank, Peterson, T. (2002). Observed coherent changes in climatic extremes during the second half of the twentieth century. *Climate Research* **19**, 193–212.
- García-París, M., Montori, A., Herrero, P. (2004). *Amphibia. Lissamphibia. – Fauna Iberica*, vol. 24. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid, 640 pp., ISBN 84-00-08292-3
- Gervasi, S., Foufopoulos, J. (2008). Costs of plasticity: responses to desiccation decrease post-metamorphic immune function in a pond-breeding amphibian. *Functional Ecology* **22**, 100–108
- Gibbons, J., Scott, D., Ryan, T., Buhlmann, k., Tuberville, T., Metts, B., Greene, J., Mills, T., Leiden, Y., Poppy, S., Winne, C. (2000). The Global decline of reptiles, déjà vu amphibians. *BioScience* **50**, 653-666
- Giorgi, F., Lionello, P. (2007). Climate change projections for the Mediterranean region. *Global and Planetary Change* **63**, 90-104
- Godinho, R., Teixeira, J., Rebelo, R., Segurado, P., Loureiro, A., Álvares, F., Gomes, N., Cardoso, P., Camilo-Alves, C., Brito, J. (1999). *Atlas of the continental*

- Portuguese herpetofauna: an assemblage of published and new data. *Herpetologica* **13**, 61-82
- Gosner, K. (1960). A Simplified Table for Staging Anuran Embryos and Larvae with Notes on Identification. *Herpetologica* **16**, 183-190.
- Hensen, D., Faerovig, P., Andersen, T. (2002). Light, nutrients, and P: C ratios in algae: grazer performance related to food quality and quantity. *Ecology* **83**, 1886-1898
- Hunte-Brown M., (2006). The effects of extirpation of frogs on the trophic structure in tropical montane streams in Panama. PhD Dissertation, Drexel University, Philadelphia, Pennsylvania'
- Jakob, C., Poizat, G., Veith, M., Seitz, A., Crivelli (2003). Breeding phenology and larval distribution of amphibians in a Mediterranean pond network with unpredictable hydrology. *Hydrobiologia* **499**, 51–61.
- Jungu, P., Beniston, M. (2001). Changes in the anomalies of extreme temperature in the 20th century at Swiss climatological stations located at different latitudes and altitudes. *Theoretical and Applied. Climatology*. **69**, 1-12.
- Kaya, U., Agasyan, A., Avisi, A., Boris Tuniyev, B., Isailovic, J., Lymberakis, P., Andrén, C., Cogalniceanu, D., Wilkinson, J., Ananjeva, N., Üzümlü, N., Orlov, N., Podlousky, R., Tuniyev, S., (2009). *Hyla arborea*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Downloaded on 24 February 2015.
- Keith, D., Mahony, M., Hines, H., Elith, J., Regan, T., Baumgartner, J., Hunter, D., Herard, G., mitchell, N., Parris, K., Penman, T., Scheele, B., Simpson, C., Tingley, R., Tracy, C., West, M., Akçakaya, H. (2014). Detecting extinction risk from climate change by IUCN red list criteria. *Conservation Biology* **28**, 810-819
- Kiesecker, J.M., Blaustein, A.R., Belden, L.K. (2001). Complex causes of amphibian declines. *Nature* **410**, 681–684.
- Kupferberg, S. J. (1997). The Role of Larval Diet in Anuran Metamorphosis. *American Zoology* **37**, 146-159

- Lannoo, M.J., Lang, K., Waltz, T. & Phillips, G.S. (1994). An altered amphibian assemblage: Dickinson County, Iowa, 70 years after Frank Blanchard's survey. *American Midland Naturalist* **131**, 311–319
- Liess, A., Rowe, O., Guo, J., Thomsson, G., Lind, M. (2013). Hot tadpoles from cold environments need more nutrients – life history and stoichiometry reflects latitudinal adaptation. *Journal Animal Ecology* **111**, 1365-2656.
- Lips, K. (1998). Decline of a Tropical Montane Amphibian Fauna. *Conservation Biology* **12**, 106-107
- Lips, K. (1999). Mass mortality and population declines of anurans at an upland site in western Panama. *Conservation Biology* **13**, 117–125
- Márquez-García, M., Correa-Solis, M., Sallaberry, M., Méndez, M. (2009). Effects of pond drying on morphological and life-history traits in the anuran *Rhinellus pinulosa* (Anura: Bufonidae). *Evolutionary Ecology Research* **11**, 803–815
- Meehl, G., Tebaldi, C. (2004). More intense, more frequent, and longer lasting heat waves in the 21st century. *Science*, Vol 305, Pp 994-997
- Meehl, G., Zwiers, F., Evens, J., Knutson, T., Mearns, L., Whetton, P (2000). Trends in Extreme Weather and Climate Events: issues related to modeling extremes in projections of future climate change. *Bulletin of the American Meteorological Society* **81**, 427-436
- Merchán, T., Sillero, N., Lizana, M., Fontana, F. (2004). Nuevos hallazgos de la ranita meridional (*Hyal meridionalis* Boettger, 1874) en la provincia de Salamanca. *Bol AHE* **15**, 81-85
- Mifsud, D. (2014). A status assesement and review of the herpetofauna within the Saginaw Bay of Lake Huron. *Journal of Great Lakes Research* **40** 183-191
- Ortiz-Santaliestra, M. E., Fisher, M. C., Fernández-Beaskoetxea, S., Fernández-Benítez, M. J., Bosch, J. (2011). Ambient Ultraviolet B Radiation and Prevalence of Infection by *Batrachochytrium dendrobatidis* in Two Amphibian Species. *Conservation Biology* **25**, 975–982
- Oza, G. (1990). Ecological effects of the frog's leg trade. *Environmentalist* **10**, 39–41

- Paglianti, A., Gherardi, F. (2004). Combined effects of temperature and diet in growth and survival of young-of-year crayfish: a comparison between indigenous and invasive species. *Journal of Crustacean Biology* **24**, 140-148
- Preston, D., Henderson, J., Johnson, P. (2012). Community ecology of invasions: direct and indirect effects of multiple invasive species on aquatic communities. *Ecology* **93**, 1254-1261
- Reusch, T.; Ehlers, A., Hämmerli, A., Worm, B. (2005). Ecosystem recovery after climatic extremes enhanced by genotypic diversity. *PNAS* **102**, 2826-2831
- Richter-Boix, A., Llorente, G., Montori, A. (2006). A comparative analysis of the adaptive developmental plasticity hypothesis in six Mediterranean anuran species along a pond permanency gradient. *Evolutionary Ecology Research* **8**, 1139-1154
- Rodríguez, C., Bécares, E., Fernández-Aláez, M., Fernández-Aláez, C. (2005). Loss of diversity and degradation of wetlands as a result of introducing exotic crayfish. *Biological Invasions* **7**, 75-85
- Rome, L., Stevens, E., John-Alder, H. (1992). Temperature and thermal acclimation and physiological function. *Environmental Physiology of the Amphibia*; Feder, M.E., Burggren, W.W., Eds.; University of Chicago Press: London, 183-205
- Rudolf, V., Singh, M. (2013). Disentangling climate change effects on species interactions: effects of temperature, phenological shifts, and body size. *Oecologia* **173**, 1043-1052
- Schär, C., Vidale, P., Lütch, D., Frei, C., Häberli, C., Liniger, M., Appenzeller, C. (2004). The role of increasing temperature variability for European summer heatwaves. *Nature* **427**, 332–336
- Schiesari, L., Werner, E. E., Kling, G. W. (2009). Carnivory and resource-based niche differentiation in anuran larvae: implications for food web and experimental ecology. *Freshwater Biology* **54**, 572-586
- Scott, P. A., D. A. Stone, Allen, M. R., (2004). Human contribution to the European heatwave of 2003. *Nature* **432**, 610–614.

- Searcy, C., Snaas, H., Shaffer, B. (2014). Determinants of size at metamorphosis in an endangered amphibian and their projected effects on population stability. *Oikos* **0**, 1-8
- Semlitsch, R. (2000). Principles for management of aquatic-breeding amphibians. *The Journal of Wildlife Management* **64**, No 3, 615-631
- Semlitsch, R. D. (1987). Relationship of pond drying to the reproductive success of the salamander *Ambystoma talpoideum*. *Copeia* **1**, 61-69
- Sillero, N. (2009). Modelling a species expansion at local scale: is *Hyla meridionalis* colonising new areas in Salamanca, Spain? *Acta Herpetologica* **4**, 37-46
- Sterner, R., Elser, J. (2002). Ecological Stoichiometry. Princeton University Press, Princeton
- Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A. S. L., Fischman, D. L., Waller, R. W. (2004). Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* **306**, 1783–1786
- Todd, B., Scott, D., Pechmann, J., Gibbons, J. (2011). Climate change correlates with rapid delays and advancements in reproductive. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* **278**, 2191-2197
- Toranza, C., Maneyro, R. (2013). Potential effects of climate change on the distribution of an endangered species: *Melanophryniscus montevidensis* (Anura: Bufonidae). *Journal of Herpetology* **12**, 97-106
- Trigo, R., Ramos, A., Nogueira, P., Santos, F., Garcia-Herrera, R., Gouveia, C., Santo, F. (2009). Evaluating the impact of extreme temperature based indices in the 2003 heatwave excessive mortality in Portugal. *Environmental Science & Policy* **2**, 844-854
- Vinagre, C., Leal, I., Mendonça, V., Flores, A. (2015). Effect of warming rate on the critical thermal maxima of crabs, shrimp and fish. *Journal of Thermal Biology* **47**, 19-25
- Wake, D., Vredenburg, V. (2008). Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *PNAS* **105**, Supplement 1

- Walls, S., Waddle, J., Faulkner, Stephen. (2013). Wetland reserve program enhances site occupancy and species richness in assemblages of anuran amphibians in the Mississippi Alluvial Valley, USA. *Wetlands* **34**, 197-207
- Zancolli, G., Steffan-Dewenter, I., Rödel, M. (2014). Amphibian diversity on the roof of Africa: unveiling the effects of habitat degradation, altitude and biogeography. *Diversity and Distributions* **20**, 297-308

# Anexos

Anexo 1 Resultados das análises estatísticas para todas as variáveis analisadas

Variáveis	Variáveis	F	P value
Comportamento 1º onda de calor	Temperatura	8,583	<0,01
	Dieta	15,297	<0,01
	Data	1,284	0,277
	Temperatura*Dieta	1,655	0,128
	Temperatura*Data	3,025	0,006
	Dieta*Data	0,307	0,873
	Temperatura*Dieta*Data	1,187	0,290
Comportamento 2º onda de calor	Temperatura	1,252	0,287
	Dieta	4,36	0,013
	Data	0,003	0,997
	Temperatura*Dieta	1,241	0,282
	Temperatura*Data	0,9	0,494
	Dieta*Data	0,846	0,496
	Temperatura*Dieta*Data	0,907	0,518
Comprimento da cabeça a meio da experiência	Temperatura	26,469	<0,01
	Dieta	5,333	<0,01
	Temperatura*Dieta	1,775	0,109
	Comprimento dia 1	40,714	<0,01
Peso (dia 30)	Temperatura	14,6	<0,01
	Dieta	15,462	<0,01
	Temperatura*Dieta	1,263	0,279
Estádios de desenvolvimento (dia 30)	Temperatura	38,08	<0,01
	Dieta	11,5	<0,01
	Temperatura*Dieta	1,6	0,3317
Período Larvar	Temperatura	169,325	<0,01
	Dieta	49,564	<0,01
	Temperatura*Dieta	13,564	<0,01
SVL dos recém- metamorficos	Temperatura	5,566	<0,01
	Dieta	40,435	<0,01
	Temperatura*Dieta	1,551	0,143
	SVL	2,122	0,147



<b>Peso dos recém-metamórficos</b>	<b>Temperatura</b>	14,197	<0,01
	<b>Dieta</b>	24,639	<0,01
	<b>Temperatura*Dieta</b>	4,734	<0,01
	<b>SVL</b>	24,226	<0,01
<b>TFL/SVL</b>	<b>Temperatura</b>	0,92	0,394
	<b>Dieta</b>	26,661	<0,01
	<b>Temperatura*Dieta</b>	4,149	<0,01
	<b>SVL</b>	286,739	<0,01
<b>Saltos/TFL</b>	<b>Temperatura</b>	2,463	0,048
	<b>Dieta</b>	9,83	<0,01
	<b>Temperatura*Dieta</b>	1,186	0,311
	<b>TFL</b>	40,339	<0,01
<b>Resistência/Peso</b>	<b>Temperatura</b>	2,503	0,052
	<b>Dieta</b>	0,066	0,542
	<b>Temp*Dieta</b>	1,135	0,133
	<b>Peso Fresco</b>	0,58	0,447

**Anexo 2 Resultados dos testes *a posteriori* para os efeitos da temperatura no comprimento da cabeça dos girinos (dia 30) (NS - não significativo)**

	F	OC1	N	Q
F		<0,01	0,018	<0,01
OC1	<0,01		NS	<0,01
N	0,018	NS		<0,01
Q	<0,01	<0,01	<0,01	

**Anexo 3 Resultados dos testes *a posteriori* para os efeitos da dieta no comprimento da cabeça dos girinos (dia 30) (NS - não significativo)**

	A	M	P
A		0,047	NS
M	0,047		NS
P	NS	NS	

**Anexo 4 Resultados dos testes *a posteriori* para os efeitos da temperatura no peso (dia 30) (NS - não significativo)**

	F	OC1	N	Q
F		<0,01	<0,01	<0,01
OC1	<0,01		NS	NS
N	<0,01	NS		NS
Q	<0,01	NS	NS	

**Anexo 5 Resultados dos testes *a posteriori* para os efeitos da dieta no peso (dia 30) (NS - não significativo)**

	A	M	P
A		<0,01	<0,01
M	<0,01		NS
P	<0,01	NS	

**Anexo 6 Resultados dos testes *a posteriori* para os efeitos da temperatura no estágio de desenvolvimento dos girinos (dia 30) (NS - não significativo)**

	F	OC1	N	Q
F		<0,01	<0,01	<0,01
OC1	<0,01		NS	<0,01
N	<0,01	NS		<0,01
Q	<0,01	<0,01	<0,01	

**Anexo 7 Resultados dos testes *a posteriori* para os efeitos da dieta no estágio de desenvolvimento dos girinos (dia 30) (NS - não significativo)**

	A	M	P
A		<0,01	<0,01
M	<0,01		NS
P	<0,01	NS	

**Anexo 8 Resultados dos testes *a posteriori* para os efeitos da temperatura no SVL (NS - não significativo)**

	F	OC1	OC2	N	Q
F		0,02	0,02	NS	<0,01
OC1	0,02		NS	NS	NS
OC2	0,02	NS		NS	NS
N	NS	NS	NS		0,02
Q	<0,01	NS	NS	0,02	

**Anexo 9 Resultados dos testes *a posteriori* para os efeitos da dieta no SVL (NS - não significativo)**

	A	M	P
A		NS	<0,01
M	NS		<0,01
P	<0,01	<0,01	

**Anexo 10 Resultados dos testes *a posteriori* para os efeitos da temperatura nos 3 maiores saltos/TFL (NS - não significativo)**

	F	OC1	OC2	N	Q
F		NS	NS	NS	NS
OC1	NS		NS	NS	NS
OC2	NS	NS		NS	NS
N	NS	NS	NS		NS
Q	NS	NS	NS	NS	

**Anexo 11 Resultados dos testes *a posteriori* para os efeitos da dieta nos 3 maiores saltos/TFL (NS - não significativo)**

	A	M	P
A		<0,01	<0,01
M	<0,01		<0,01
P	<0,01	<0,01	

**Anexo 12 Resultados dos testes *a posteriori* para os efeitos da temperatura na resistência/peso (NS - não significativo)**

	F	OC1	OC2	N	W
F		NS	0,043	NS	NS
OC1	NS		NS	NS	NS
OC2	0,043	NS		NS	NS
N	NS	NS	NS		NS
Q	NS	NS	NS	NS	

**Anexo 13 Resultados do Teste *a posteriori* de Bonferroni para a análise da interacção entre temperatura e dieta no período larvar**

(NS - não significativo)

		F			OC1			OC2			N			Q		
		A	M	P	A	M	P	A	M	P	A	M	P	A	M	P
F	A		NS	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
F	M	NS		<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	NS	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
F	P	<0,01	<0,01		<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
OC1	A	<0,01	<0,01	<0,01		NS	NS	NS	NS	0,02	NS	NS	NS	NS	<0,01	<0,01
OC1	M	<0,01	<0,01	<0,01	NS		<0,01	<0,01	NS	<0,01	<0,01	NS	<0,01	NS	<0,01	NS
OC1	P	<0,01	<0,01	<0,01	NS	<0,01		NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,049	<0,01	<0,01
OC2	A	<0,01	<0,01	<0,01	NS	<0,01	NS		NS	NS	NS	NS	NS	NS	<0,01	<0,01
OC2	M	<0,01	<0,01	<0,01	NS	NS	NS	NS		NS	NS	NS	NS	NS	<0,01	<0,01
OC2	P	<0,01	NS	<0,01	0,02	<0,01	NS	NS	NS		NS	0,03	NS	<0,01	<0,01	<0,01
N	A	<0,01	<0,01	<0,01	NS	<0,01	NS	NS	NS	NS		NS	NS	0,037	<0,01	<0,01
N	M	<0,01	<0,01	<0,01	NS	NS	NS	NS	NS	0,03	NS		NS	NS	<0,01	<0,01
N	P	<0,01	<0,01	<0,01	NS	<0,01	NS	NS	NS	NS	NS	NS		<0,01	<0,01	<0,01
Q	A	<0,01	<0,01	<0,01	NS	NS	0,049	NS	NS	<0,01	0,037	1,000	<0,01		<0,01	NS
Q	M	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01		NS
Q	P	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	NS	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	NS	NS	

**Anexo 14 Resultados do Teste *a posteriori* de Bonferroni para a análise da interação entre temperatura e dieta no peso após a metamorfose**

(NS - não significativo)

		F			OC1			OC2			N			Q		
		A	M	P	A	M	P	A	M	P	A	M	P	A	M	P
F	A		NS	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	NS	<0,01	<0,01	NS	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
F	M	NS		<0,01	<0,01	NS	<0,01	<0,01	NS	<0,01	<0,01	NS	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
F	P	<0,01	<0,01		NS	NS	NS	NS	0,039	NS	NS	<0,01	NS	NS	NS	NS
OC1	A	<0,01	0,03	NS		NS	0,024	NS	NS	NS	NS	NS	<0,01	NS	NS	NS
OC1	M	<0,01	NS	NS	NS		<0,01	NS	NS	<0,01	NS	NS	<0,01	0,026	<0,01	<0,01
OC1	P	<0,01	<0,01	NS	0,024	<0,01		NS	<0,01	NS	<0,01	<0,01	NS	NS	NS	NS
OC2	A	<0,01	<0,01	NS	NS	NS	NS		0,042	NS	NS	<0,01	NS	NS	NS	NS
OC2	M	NS	NS	0,039	NS	NS	<0,01	0,042		<0,01	NS	NS	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
OC2	P	<0,01	<0,01	NS	NS	<0,01	NS	NS	<0,01		NS	<0,01	NS	NS	NS	NS
N	A	<0,01	<0,01	NS	NS	NS	0,045	NS	NS	NS		<0,01	0,014	NS	NS	NS
N	M	NS	NS	<0,01	NS	NS	<0,01	<0,01	NS	0,03	<0,01		<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
N	P	<0,01	<0,01	NS	<0,01	<0,01	NS	NS	<0,01	NS	<0,01	<0,01		NS	NS	NS
Q	A	<0,01	<0,01	NS	NS	0,026	NS	NS	<0,01	NS	NS	<0,01	NS		NS	NS
Q	M	<0,01	<0,01	NS	NS	<0,01	NS	NS	<0,01	NS	NS	<0,01	NS	NS		NS
Q	P	<0,01	<0,01	NS	NS	<0,01	NS	NS	<0,01	NS	NS	<0,01	NS	NS	NS	

**Anexo 15 Resultados do Teste *a posteriori* de Bonferroni para a análise da interação entre temperatura e dieta para o TFL/SVL (NS - não significativo)**

		CS			ESHW			LSHW			NS			WS		
		A	M	P	A	M	P	A	M	P	A	M	P	A	M	P
CS	A		NS	<0,01	<0,01	NS	<0,01	<0,01	NS	<0,01	<0,01	NS	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
CS	M	NS		<0,01	<0,01	NS	<0,01	<0,01	NS	<0,01	<0,01	NS	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
CS	P	<0,01	<0,01		<0,01	<0,01	NS	<0,01	<0,01	NS	<0,01	<0,01	NS	0,015	<0,01	NS
EHWS	A	<0,01	<0,01	<0,01		<0,01	NS	NS	<0,01	<0,01	NS	<0,01	NS	NS	NS	NS
EHWS	M	NS	NS	<0,01	0,000		<0,01	<0,01	NS	<0,01	<0,01	NS	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
EHWS	P	<0,01	<0,01	NS	NS	<0,01		NS	<0,01	NS	<0,01	<0,01	NS	NS	<0,01	NS
LHWS	A	<0,01	<0,01	<0,01	NS	<0,01	NS		<0,01	0,036	NS	<0,01	NS	NS	NS	NS
LHWS	M	NS	NS	<0,01	<0,01	NS	<0,01	<0,01		<0,01	<0,01	NS	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
LHWS	P	<0,01	<0,01	NS	<0,01	<0,01	NS	0,036	<0,01		<0,01	<0,01	NS	NS	<0,01	NS
NS	A	<0,01	<0,01	<0,01	NS	<0,01	<0,01	NS	<0,01	<0,01		<0,01	0,042	NS	NS	0,024
NS	M	NS	NS	<0,01	<0,01	NS	<0,01	<0,01	NS	<0,01	<0,01		<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
NS	P	<0,01	<0,01	NS	NS	<0,01	NS	NS	<0,01	NS	0,042	<0,01		NS	0,015	NS
WS	A	<0,01	<0,01	0,015	NS	<0,01	NS	NS	<0,01	NS	NS	<0,01	NS		NS	NS
WS	M	<0,01	<0,01	<0,01	NS	<0,01	<0,01	NS	<0,01	<0,01	NS	<0,01	0,015	NS		<0,01
WS	P	<0,01	<0,01	NS	NS	<0,01	NS	NS	<0,01	NS	0,024	<0,01	NS	NS	<0,01	